

**Immunhistochemische Charakterisierung neuer Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloid  
Antikörper im Tg2576 Mausmodell der Alzheimer Demenz**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Katarina Dušek  
Geboren am 30.04.1992 in Nitra

angefertigt am: Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung  
Universität Leipzig  
Liebigstr. 19  
04103 Leipzig

Betreuer: Professor Dr. rer. nat. habil. Steffen Roßner

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 18.04.2017

---

## Inhaltsverzeichnis:

Bibliographische Beschreibung.....	4
Abkürzungsverzeichnis .....	5
1 Einführung .....	6
1.1 Morbus Alzheimer .....	6
1.2 $\beta$ -Amyloid.....	9
1.3 Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloid-Peptid .....	12
2 Aufgabenstellung .....	14
3 Material und Methoden .....	15
3.1 Verwendete Antikörper .....	15
3.2 Transgene Tg2576-Mäuse .....	15
3.3 Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie .....	18
3.4 Immunhistochemische Untersuchungen.....	18
3.4.1 Visualisierung mittels DAB .....	18
3.4.2 Doppelmarkierungen mittels Immunfluoreszenz .....	19
3.5 Mikroskopie.....	20
3.5.1 Digitalmikroskopie.....	20
3.5.2 Quantifizierung der Plauefläche.....	20
4 Ergebnisse .....	21
4.1 Charakterisierung des Gehirngewebes .....	21
4.2 Darstellung von pE-A $\beta$ -Ablagerungen mit fünf verschiedenen Antikörpern .....	23
4.3 Verdünnungsreihen der primären pE-A $\beta$ -Antikörper.....	24
4.3.1 Antikörper Synaptic Systems .....	26
4.3.2 Antikörper K17 .....	26
4.3.3 Antikörper K6 .....	26
4.3.4 Antikörper F8 .....	26
4.4 Quantifizierung der A $\beta$ -Plaue-Beladung .....	30
4.4.1 Antikörper von Synaptic Systems .....	31
4.4.2 Antikörper K17 .....	33
4.4.3 Antikörper K6 .....	35
4.4.4 Antikörper F8 .....	37
4.4.5 Direkter Vergleich der verschiedenen Antikörper .....	39
4.5 Doppelimmunfluoreszenz.....	41
4.6 Doppelmarkierung der Antikörper mit dem pan-A $\beta$ -Antikörper 4G8 .....	43

5	Diskussion.....	44
5.1	Methodische Betrachtung .....	44
5.2	Charakterisierung des Gehirngewebes .....	45
5.3	Darstellung von pE-A $\beta$ -Ablagerungen mit den fünf verschiedenen Antikörpern.....	46
5.4	Verdünnungsreihen.....	46
5.5	Screening der verschiedenen Antikörper.....	48
5.5.1	Antikörper Synaptic Systems .....	48
5.5.2	Antikörper K17 .....	49
5.5.3	Antikörper K6 .....	50
5.5.4	Antikörper F8.....	51
5.5.5	Direkter Vergleich der verschiedenen Antikörper .....	51
5.6	Doppelimmunfluoreszenz der getesteten Antikörper .....	53
5.7	Ausblick der Arbeit .....	54
6	Zusammenfassung der Arbeit .....	55
7	Literaturverzeichnis .....	59
8	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....	62
9	Lebenslauf.....	63
10	Danksagung.....	64

**Immunhistochemische Charakterisierung neuer Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloid Antikörper  
im Tg2576 Mausmodell der Alzheimer Demenz**

Universität Leipzig, Dissertation

64 Seiten, 40 Literaturverweise, 21 Abbildungen, 4 Tabellen

Referat:

Die biologischen Grundlagen und sozioökonomischen Auswirkungen der Alzheimerschen Erkrankung sind ein aktuelles Thema unserer immer älter werdenden Gesellschaft. Doch bis heute sind nicht alle pathophysiologischen Vorgänge erforscht, um die Ursachen dieser Erkrankung zu verstehen und damit Ansätze für eine adäquate Therapie zu ermöglichen. Neue Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Bildung des toxischen Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloids Ursache des Neuronenuntergangs sein kann. Ziel dieser Arbeit war es, vier neue monoklonale Antikörper hinsichtlich ihrer Eignung zur immunhistochemischen Darstellung von Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloid im Gehirn transgener Mäuse mit  $\beta$ -Amyloid-Pathologie zu untersuchen.

Für diese Studie wurde das transgene Tg2576-Mausmodell gewählt, in welchem die Plaquebelastung im Gehirn in verschiedenen Altersstufen immunhistochemisch dargestellt wurde. Durch die Quantifizierung der Plaquefläche mittels Digitalmikroskop und Analyse-Software, konnte ein aussagekräftiger Vergleich der verschiedenen Antikörper gewährleistet werden. Doppelmarkierungen mittels Immunfluoreszenz dienten als Nachweis dafür, dass die Antikörper gegen dasselbe Protein gerichtet sind und dieses visualisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Eignung dieser neuen Antikörper für die immunhistochemische Visualisierung bestimmter Plaquekomponenten im transgenen Mausmodell und können für Studien zur experimentellen Beeinflussung der Plaque-Pathologie verwendet werden. Des Weiteren ist eine Nutzung zur Darstellung der Plaque-Pathologie in humanem Hirngewebe denkbar.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Disease (Alzheimer Erkrankung)
AK	Antikörper
ApoE4	Apolipoprotein E4
APP	Amyloid-Precursor-Protein
A $\beta$	$\beta$ Amyloid
BACE1	$\beta$ -site of APP cleaving enzyme oder $\beta$ -Secretase
BSA	Rinderserum-Albumin
Cy2	Carbocyanin 2 (Grün)
Cy3	Carbocyanin 3 (Rot)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
PB	Phosphatpuffer
pE-A $\beta$	Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloid-Peptid
QC	Glutaminy Cyclase
SySy	Synaptic Systems
TBS	Tris-gepuffertes Kochsalz
WT	Wildtyp

# 1 Einführung

## 1.1 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer Erkrankung, international als Alzheimer Disease (AD) geläufig, ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und macht mindestens 50% aller Formen aus (Medeiros & LaFerla, 2013). Die Prävalenz liegt bei der über 65 Jahre alten Bevölkerung bei 5-8% und das Risiko an AD zu erkranken wächst mit steigendem Alter. Der Begriff Demenz trägt seine Wurzeln im Lateinischen, das Wort >mens< steht für „Verstand“ oder „Geist“ und Demenz bedeutet „ohne Verstand“ oder „ohne Geist“ zu sein. Der Begriff „Alzheimer“ geht auf den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer (1864-1915) zurück, der schon 1906 erstmals vom Krankheitsbild einer Alzheimer Demenz berichtete. Durch klinische und mikroskopische Untersuchungen am Gehirn einer Patientin, konnte er schon vor über 100 Jahren die wesentlichen Veränderungen einer AD in der „Allgemeinen Zeitung für Psychiatrie“ im Jahre 1907 veröffentlichen.

Die AD wird je nach klinischem Bild in drei Stadien eingeteilt (frühes, mittleres und spätes Demenzstadium). Im Durchschnitt dauert es sechs bis acht Jahre, bis ein Patient am Punkt einer späten schweren Demenz angelangt ist, die in der Pflegebedürftigkeit endet (Medeiros & LaFerla, 2013). Das frühe Stadium ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Lernschwäche, die Bewältigung komplexer Aufgaben ist nicht mehr möglich. Wortfindungs- und Orientierungsschwierigkeiten treten in den Vordergrund. Das Benennen und Erkennen von Gegenständen ist erschwert. Im weiteren Verlauf verblasst die Erinnerung an die eigene Biographie, Zusammenhänge sind nicht mehr klar erkennbar, eine floskelhafte Sprache mit Paraphasie tritt ein, es kommt zum Nichterkennen von vertrauten Personen und es treten Störungen der räumlichen Orientierung bis hin zur optischen Apraxie auf. Diese Symptome sprechen für eine mittelgradige AD. Das Spätstadium ist geprägt von einem hochgradigen intellektuellen Abbau und vollständiger Pflegebedürftigkeit. Die körperlichen Krankheitszeichen gipfeln in vollständiger Inkontinenz, Gehstörungen, Unfähigkeit zur Kontrolle der Körperhaltung, zerebralen Krampfanfällen und Schluckstörungen.

Die genetische Vererbung als Ursache des Ausbruchs der Krankheit gilt nur bei der familiären AD als gesichert. Es gibt allerdings Risikofaktoren, die den Ausbruch der Demenz fördern oder beschleunigen. Dazu gehören Gene, die auf den Chromosomen 1,14,19 und 21 lokalisiert sind. Die Trisomie 21, auch als Down-Syndrom bezeichnet, besitzt eine Korrelation mit der AD von 98% (Bertram, Lill, & Tanzi, 2010). Ursächlich dafür ist ein Gen, welches auf diesem Chromosom exprimiert wird. Dieses ist für die Bildung des Amyloidvorläuferproteins

(APP) verantwortlich. Durch das dreimalige Vorhandensein dieses Gens kommt es zur vermehrten Bildung eines APP-Spaltprodukts, des  $\beta$ -Amyloids. Bei der familiär gehäuften AD werden auf diesem Gen lokalisierte Punktmutationen beobachtet. Die früh beginnende familiäre Form der AD kann mit Mutationen auf Chromosom 1 und 14 in Verbindung gebracht werden. Man findet Präsenilin 2 auf Chromosom 1 und Präsenilin 1 auf Chromosom 14. Alle diese Mutationen führen auf unterschiedlichen Wegen zur Erhöhung des Spaltproduktes  $\beta$ -Amyloid-Protein, welchem die Ätiopathologie der AD zugeschrieben wird (siehe 1.2  $\beta$ -Amyloid) (Bertram, Lill, & Tanzi, 2010).

Des Weiteren wird bei spät beginnenden familiären und sporadischen Formen eine Genvariante im Apolipoprotein E4 (ApoE4) erfasst, die sich auf dem Chromosomen 19 lokalisieren lässt (Saido, 1998). Unter den zahlreichen Apolipoproteinen ist das ApoE im Gehirn vorzufinden, jedoch existieren drei Isoformen: Apo E2, E3 und E4. Eine erhöhte Allelfrequenz des E4-Subtyps ist bei familiären und auch bei den sporadischen Fällen der AD zu erkennen. Es wird diskutiert, dass ApoE4 im Gegensatz zu ApoE2 und ApoE3 das Tauprotein, als Grundbaustein von Neurofibrillen, ungenügend vor der krankhaften Verstoffwechslung (einer Phosphorylierung) schützt. Des Weiteren verfügt ApoE über die Fähigkeit A $\beta$  zu binden. Es besteht weiterhin die Annahme, dass es an der Ausschleusung von A $\beta$  aus dem Gehirn beteiligt ist. Trotz zahlreicher Untersuchungen bleibt ungeklärt, warum viele Patienten auch ohne ApoE4 eine AD entwickeln oder einige ApoE4-Träger von der Erkrankung verschont bleiben. Es kann lediglich bestätigt werden, dass die Expression des ApoE4 mit dem erhöhten Risiko an einer AD zu erkranken einhergeht (Bertram, Lill, & Tanzi, 2010).

Diese Faktoren sind nur ein Teil der angenommenen Ursachen einer AD. Es werden auch Umweltgifte, Vergiftungen mit Metallen, Autoimmunprozesse, Durchblutungsstörungen und Störungen der chemischen Transmitter des Gehirnstoffwechsels als Ursachen in Betracht gezogen. Am wahrscheinlichsten sind Kombinationen mehrerer dieser inneren und äußeren Einflüsse für das Beschwerdebild der AD verantwortlich (Krämer & Förstl, 2008).

Das Gedächtnis kann in Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis unterteilt werden. Das Kurzzeitgedächtnis spielt eine Rolle für eine schnelle Speicherung, die aber auch schnell wieder vergessen wird, wie zum Beispiel eine Adresse, die man ins Navigationssystem eingeben muss. Nach der Eingabe verschwindet diese Adresse schnell wieder aus unserem Gedächtnis. Das Langzeitgedächtnis wird hingegen tiefer verankert und ist zudem wieder abrufbar. Man unterscheidet das deklarative Gedächtnis, welches sich wiederum in das

semantische (Faktenwissen) und das episodische Gedächtnis (Ereignisse) untergliedert, und das prozedurale Gedächtnis, welches gelernte Fähigkeiten verschlüsselt. Diese Fähigkeiten sind unbewusst und nicht abrufbar, aber stets vorhanden (z.B. das Fahrradfahren). Im Gegensatz dazu sind wir fähig, das deklarative Gedächtnis bewusst abzurufen.

Bei jedem Lernprozess sind verschiedene Neuronengruppen beteiligt. Aus verschiedenen Arealen im gesamten Cortex werden Informationen zusammengestellt. Die Neuronen verbinden sich über Synapsen und bilden somit eine Gedächtnisspur zu Hirngebieten, die das Erlernte speichern können. Ein wichtiges Hirngebiet für die Gedächtnisbildung ist der Hippocampus, welcher im Temporallappen lokalisiert ist. Über diese Hirnstrukturen erfolgt das Überführen vom Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis. Der Hippocampus besteht aus mehreren Strukturen, weshalb er auch als Hippocampusformation bezeichnet wird. Dem angrenzend liegt der rhinale Cortex, welcher in reger Verbindung zum Hippocampus steht. Beide Strukturen sind vor allem für die Bildung des deklarativen Gedächtnisses von großer Bedeutung. Speziell die Hippocampusregion erhält Informationen höherer Ordnung aus dem Assoziationsgebieten des Cortex und spielt somit die Schlüsselrolle bei der Gedächtnisbildung (Savonenko, et al., 2012) (Wilson & McNaughton, 1993). Auch das Ortsgedächtnis wird im Hippocampus gebildet und gespeichert. Dies konnte ein Experiment von Wilson und McNaughton im Jahr 1993 belegen. Eine Ratte erkundete zehn Minuten lang eine Kiste mit Trennwand, wobei in deren neuronalen Zellen des Hippocampus eine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Diese Aktivität verblasste in der neuronalen Zelle nach dem Entfernen der Trennwand, da dieser Ort unbekannt war. Erst zehn Minuten später konnte eine erneute Aktivierung der Ortszelle abgeleitet werden und die Ratte konnte sich in der nun großen Kiste voll orientieren (Wilson & McNaughton, 1993). Gedächtnis- und Orientierungsdefizite zählen zu 62% als Erstbeschwerden von Patienten mit AD (Krämer & Förstl, 2008). Deswegen wird diesen Strukturen ein besonderer Stellenwert in der Erforschung der AD zugeschrieben.

Die AD ist gekennzeichnet durch einen Untergang der Nervenzellen, wobei es im späteren Verlauf der Erkrankung zur Ausbildung starker Hirnatrophien kommt (Ballatore, Lee, & Trojanowski, 2007). Dem langen zeitlichen Verlauf geschuldet, stirbt die Hälfte aller Nervenzellen des Gehirns ab. Vordergründig ist ein Neuronenuntergang frontal und temporobasal zu beobachten. Im Hippocampus kommt es zu einem Untergang der Synapsen von bis zu 75% (Krämer & Förstl, 2008). Weiterhin sind  $\beta$ -Amyloid Ablagerungen und Neurofibrillenveränderungen als charakteristisch anzusehen. Histologisch sind Ablagerungen



-sogenannte Plaques- sichtbar, die aus  $\beta$ -Amyloid-Peptiden bestehen, und in deren Umgebung sich abnormal phosphorylierte Tau-Proteine befinden (Braak & Braak, 1991) (Hardy & Higgins, 1992).  $\beta$ -Amyloid-Peptide gelten als ursächlich für die Entstehung der AD.

## 1.2 $\beta$ -Amyloid

Das  $\beta$ -Amyloid -Peptid besteht aus 39 bis 42 Aminosäuren. Es aggregiert leicht, bildet nahezu unlösliche Fibrillen und scheint toxisch auf die umgebenden Zellen zu wirken (Nussbaum, et al., 2012). Es wird ätiopathogenetisch von einer Amyloid-Kaskaden-Hypothese ausgegangen, die gekennzeichnet ist durch eine initial vermehrte Bildung an  $A\beta$  (Hardy & Higgins, 1992). Genauer betrachtet ist es eine übermäßige Bildung von  $A\beta$  der Variante 42.  $A\beta_{40}$  und  $A\beta_{42}$  sind Hauptbestandteile der extrazellulären Alzheimer-Plaques und werden für weitere histologische Veränderungen des Morbus Alzheimer verantwortlich gemacht (Schilling, et al., 2006) (He & Barrow, 1999).

Durch die vermehrte amyloidogene Spaltung des Vorläuferproteins APP, entsteht das  $\beta$ -Amyloid-Peptid. Dieser Spaltungsweg ist auch physiologisch, findet jedoch im gesunden Stoffwechsel im geringen Umfang statt. APP ist ein Transmembranprotein, welches eine zytoplasmatische und eine extrazelluläre Domäne besitzt (Masters, Cappai, Barnham, & Villemagne, 2006). Es wird davon ausgegangen, dass das APP eine Vielzahl an interzellulären Kontakten steuert und durch Kontakte zu vielen Adapterproteinen im Zytosol auch bei verschiedenen Signalkaskaden mitwirkt. Physiologisch wird das APP enzymatisch durch die  $\alpha$ -Sekretase in der  $A\beta$ -Sequenz gespalten, sodass ein Teil des  $\beta$ -Amyloid-Peptids nach extrazellulär sezerniert wird und abgebaut werden kann, während der andere Teil intrazellulär weiter durch Peptidasen gespalten wird (Schilling, Hoffmann, Manhart, Hoffmann, & Demuth, 2004). Unter pathologischen Bedingungen erfolgt die vermehrte Spaltung nicht in der  $A\beta$ -Sequenz, sondern davor, wobei ein großes Restprotein entsteht. Diese Spaltung wird von der sogenannten  $\beta$ -Sekretase katalysiert. Dieses Enzym spaltet APP am N-Terminus der  $A\beta$ -Sequenz, die somit intakt bleibt. Eine weitere Sekretase, der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex, spaltet nun am C-Terminus des  $A\beta$ -Peptids (siehe Abb. 1) (Mawuenyega, et al., 2010). Das  $A\beta$  kann, im Gegensatz zu den anderen entstandenen Peptiden, schlechter in Lysosomen und Endosomen durch die dort enthaltenen Proteasen abgebaut werden. Der Abbau erfolgt jedoch durch Neprilysin oder Insuline-degrading-Enzyme (Edbauer, Willem, Lammich, & Haass, 2002) (Grimm M. O., et al., 2013) (Grimm M. O., et al., 2015). Diese Abbausysteme können aber nur die physiologisch entstandene

Menge an A $\beta$ -Peptid umsetzen, pathologisch hohe Werte können nicht mehr prozessiert werden. Es verbleibt in höheren Mengen und bildet somit extrazellulär die Amyloid-Plaques. Die Entstehung des Plaque bildenden  $\beta$ -Amyloids ist Folge der amyloidogenen Spaltung des APP durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase (Schilling, et al., 2008).

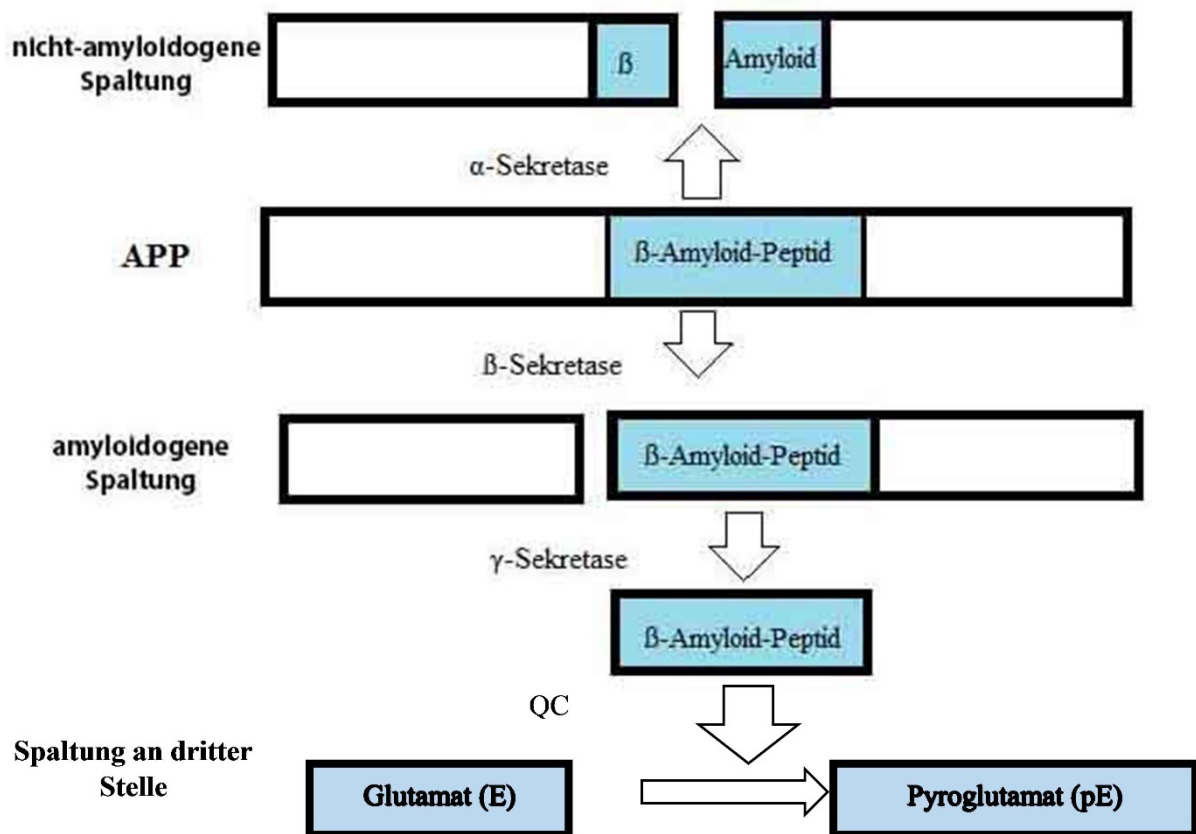


Abbildung 1: Darstellung der physiologischen Prozesse, die zur Verstoffwechselung des APP führen. Im oberen Abschnitt ist die nicht-amyloidogene Spaltung dargestellt, die physiologisch häufig vonstattengeht und bei der kein  $\beta$ -Amyloid-Peptid entsteht. Dieser Prozess wird von der  $\alpha$ -Sekretase katalysiert. Ein geringer Teil des APP wird physiologisch durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase zum  $\beta$ -Amyloid-Peptid gespalten. Durch die Glutaminyl Cyclase (QC), welche Glutamat das im  $\beta$ -Amyloid-Peptid an der dritten Stelle steht zyklisiert, entsteht das toxische pE- $\beta$ -Amyloid Peptid.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Entstehung der A $\beta$ -Plaques liegt in der Überexpression der  $\beta$ -Sekretase, welche auch als BACE1 ( $\beta$ -site of APP cleaving enzyme) bezeichnet wird. Es konnte festgestellt werden, dass bei AD Patienten die  $\beta$ -Sekretase überexprimiert wird, dies wiederum führt durch die  $\beta$ -Spaltung des APP zur vermehrten Bildung des neurotoxischen A $\beta$  (Roßner, Sastre, Bourne, & Lichtenthaler, 2006). Eine Hemmung der Überexpression bei AD könnte das Fortschreiten der Erkrankung und vor allem den neuronalen Zerfall verlangsamen, wenn nicht sogar aufhalten. Bis heute ist jedoch nicht geklärt, ob nur die Überexpression der

$\beta$ -Sekretase die erhöhte Produktion an  $A\beta$  bestimmt oder es Störungen beim Abbau der pathologischen  $A\beta$ -Peptide bzw. weitere unbekannte Pathways bei der Bildung der toxischen Peptide gibt. Womöglich sind verschiedene Mechanismen an der Anreicherung des  $A\beta$  beteiligt.

Des Weiteren konnte man bei Alzheimer-Patienten eine erhöhte Konzentration an  $A\beta_{40}$ -Peptid im Blut nachweisen, während das  $A\beta_{42}$ -Peptid in geringerer Konzentration vorzufinden ist. Es wird davon ausgegangen, dass  $A\beta$ -Peptide sich zu  $A\beta$ -Oligomeren zusammenschließen und somit die unlöslichen  $A\beta$ -Plaques im Gehirn bilden (Fodero-Tavoletti, et al., 2011). Diese löslichen  $A\beta$ -Formen korrelieren klinisch viel besser mit dem Neuronenuntergang und der Ausbildung der Neurofibrillen, als es die nicht löslichen  $A\beta$ -Plaques tun. Obwohl der Anteil am Gesamt- $A\beta$  nur ca. 1% ausmacht, ist die Bestimmung des löslichen  $A\beta$  von ausschlaggebenderer Bedeutung für die Diagnostik der AD (McLean, et al., 1999).

Diese zahlreichen Untersuchungen bürden die Hoffnung, die Erkrankung in ihrem Fortschreiten oder gar in ihrer Entstehung bald behandeln zu können. Mit Hilfe einer aktiven Immunisierung gegen das  $A\beta$  oder der Unterdrückung der Aktivität der  $\beta$ -Sekretase sind Ansätze vorhanden, um den Neuronenuntergang einzudämmen. In einer Studie konnte 4,6 Jahre nach einer  $A\beta_{42}$ -Immunisierung ein geringer Progress der Pathologie beobachtet werden. Jedoch mussten diese Impfungen wegen eines zu hohen Nebenwirkungsprofils abgesetzt werden (Enzephalitiden) (B. Vellas & Team., 2009).

Die  $\beta$ -Amyloid-Plaques der AD sind zwar für diese Pathologie typisch, aber keinesfalls als spezifisch anzusehen. Dies wurde 1986 durch die Nonnenstudie von David Snowdon eindrücklich bewiesen. Die jahrelange Untersuchung von etwa 600 Nonnen im Alter von 76 bis 107 Jahren zeigte, dass Nonnen, die bis unmittelbar vor ihrem Tod noch geistig anspruchsvolle Aufgaben lösen konnten und somit keine AD aufwiesen, trotzdem multiple  $\beta$ -Amyloid-Plaques besaßen, wie man in einer anschließenden Sektion feststellte. Damit konnte gezeigt werden, dass die Ursache der Erkrankung nicht durch die Plaques zu erklären ist, sondern ein anderer Pathomechanismus die ursächliche Rolle spielen muss (Snowdon & StudyNun, 2003).

### 1.3 Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloid-Peptid

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung verschiedener Antikörper (AK), die spezifisch an das Pyroglutamat- $\beta$ -Amyloid-Peptid (pE-A $\beta$ ) binden. Pyroglutamat entsteht durch eine endständige Zyklisierung der freien Aminosäure Glutamat, an der 3. oder 11. Position des A $\beta$ -Peptids (Schilling, et al., 2006). Die Glutaminyl Cyclase (QC) ist das Enzym, welches diese Zyklisierung katalysiert. Man konnte in einigen Versuchen zeigen, dass die Expression der QC mit dem Vorhandensein von pE-A $\beta$  korreliert (Morawski, et al., 2014). Somit kommen der QC und dem pE-A $\beta$  wichtige Rollen in der Pathogenese der AD zu. Es wurde nachgewiesen, dass pE-A $\beta$  eine höhere Toxizität besitzt, als die unzyklisierten A $\beta$ -Formen (Nussbaum, et al., 2012).

pE-A $\beta$  ist schon in Frühphasen der AD nachweisbar und daher liegt die Vermutung nahe, dass der Neuronenuntergang, aber auch andere histologische Veränderungen ihren Ursprung im pE-A $\beta$  finden. Weiterhin wird die Oligomerisierung weiterer nicht-modifizierter A $\beta$ -Peptide *in vitro* durch das Vorhandensein von pE-A $\beta$  beschleunigt (Schilling, et al., 2006). Dies wird auch als Prion-ähnliche Wirkung bezeichnet und meint die Weitergabe der vorhandenen Fehlfaltung (Nussbaum, et al., 2012). Aufgrund dieser Versuche wird angenommen, dass pE-A $\beta$  den Beginn für die Ausbildung der pathologischen höhermolekularen Aggregate wie Dimere, Oligomere oder Fibrillen gibt, indem es immer weitere A $\beta$ -Formen zur Aggregation anregt und es somit zu vermehrten Ablagerungen, den Plaques, kommt.

Es besteht auch eine Assoziation zwischen den Tau-Proteinen und dem pE-A $\beta$ . Man konnte in einer *in vivo* Studie mit transgenen Mäusen einen neuronalen Zellverlust und eine Astrozytenaktivierung mit dem Vorhandensein von pE-A $\beta$ -Ablagerungen im Hippocampus erklären. Um diese pathologischen Veränderungen im Hippocampus auszulösen, war jedoch das Vorhandensein des Tau-Proteins von ausschlaggebender Bedeutung. Es konnten keine pathologische Veränderung bei Tau-Knock-Out-Mäusen gefunden werden. Bei Tau-Knock-Out-Neuronen *in vitro* entdeckte man den gleichen Effekt. Während diese in einer Mischung aus 5% pE-A $\beta$  und 95%  $\beta$ -Amyloid inkubiert wurden, konnte kein Neuronenuntergang festgestellt werden. Im Gegensatz dazu reagierten die Wildtypen sehr eindrücklich auf die Toxizität (Nussbaum, et al., 2012) (Russo, et al., 2002). Somit konnte gezeigt werden, dass schon geringe Mengen an pE-A $\beta$  eine erhöhte Toxizität aufweisen und diese mit dem Tau-Proteinen in enger Verbindung stehen.

Eine weitere Versuchsreihe mit transgenen Mäusen bestätigte die Annahme, dass pE-A $\beta$  den neuronalen Zelltod beschleunigt. Es konnten ein signifikant höherer Neuronenverlust (-35%

im Alter von 12 Monaten), Defizite bei der räumlichen Orientierung und dem Arbeitsgedächtnis, ein Verlust an Ängstlichkeit und verschiedenen schwere motorische Defizite im Gegensatz zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Meißner, Bouter, & Bayer, 2015).

Die Hemmung der QC zur Reduzierung des pE-A $\beta$  ist deswegen ein neuer Ansatzpunkt in der Therapie des Morbus Alzheimer geworden. Seit 2010 werden passive Immunisierungen gegen die giftigen pE-A $\beta$  Oligomere im Tierversuch getestet. Die Immunisierung besteht aus einem AK, der gegen pE-A $\beta$  gerichtet ist. Dieser bindet dann an die toxischen Oligomere und macht sie unschädlich. Im Tierversuch war der AK therapeutisch wirksam und stabilisierte das Lernverhalten. Durch diese passive Immunisierung kann keine Heilung der Erkrankung erreicht werden, aber das Fortschreiten der Krankheit könnte gestoppt werden (Frost, et al., 2013).

Weiterhin besteht ein klinischer Ansatzpunkt in der Diagnosesicherung der AD. Es wurde festgestellt, dass gesunde Probanden einen hohen Spiegel an pE-A $\beta$ -Oligomeren im Blut aufweisen. Bei Alzheimer-Patienten wird dagegen nur ein geringer Blutspiegel nachgewiesen, jedoch ist der Oligomere-Spiegel im Gehirn deutlich höher. Dadurch kommt diesem AK in der Labormedizin eine hohe Wertigkeit zu, da er vielleicht als Biomarker für die Diagnosestellung der AD eingesetzt werden könnte (Wirths, et al., 2010).

Wegen dieser hohen Bedeutung dieses AKs wurden weitere AK entwickelt, die speziell an pE-A $\beta$  binden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Vergleich dieser verschiedenen AK, die derzeit intensiv getestet werden. Es gilt, diese gleichen AK in ihrer Qualität zu untersuchen und somit auch die Eignung zur Visualisierung des zuerst entwickelten zu überprüfen.

## 2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, vier neue monoklonale AK hinsichtlich ihrer Eignung zur immunhistochemischen Darstellung von pE-A $\beta$  im Gehirn transgener Mäuse mit A $\beta$ -Pathologie zu untersuchen.

Jeder einzelne AK sollte in verschiedenen Altersstufen eines transgenen Alzheimer-Mausmodells mittels DAB-Färbungen mit dem kommerziell verfügbaren AK von Synaptic Systems verglichen und seine Eignung zur Anfärbung bewertet werden. Für diese Untersuchungen wurden transgene Mäuse des Stammes Tg2576 verwendet. Diese exprimieren humanes APP der neuronalen Isoform mit 695 Aminosäuren mit der sogenannten schwedischen Doppelmutation KM670/671NL. Durch die Quantifizierung der Plaquefläche mittels einer Analysesoftware des Digitalmikroskops Keyence, wurde ein aussagekräftiger Vergleichsparameter gewählt. Die Plaquebelastung wurde zum einen für jeden AK in jeder Altersstufe einzeln analysiert, zum anderen wurden die AK untereinander verglichen.

Durch Doppelmarkierungen mittels Immunfluoreszenz sollte nachgewiesen werden, ob die AK gleiche Plaquestrukturen erkennen und somit die Spezifität für pE-A $\beta$  besitzen. Eine weitere Färbung mittels Immunfluoreszenz sollte als Nachweis dienen, ob sich pE-A $\beta$  im Zentrum der Plaques befindet und sich nicht zyklisiertes  $\beta$ -Amyloid um das toxische pE-A $\beta$ -Protein anlagert. Für diese Visualisierung wurden die AK mit einem für nicht zyklisiertes A $\beta$ -Protein spezifischen AK, dem AK 4G8, analysiert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Antikörper

Die vier neuen zu charakterisierenden monoklonalen pE-A $\beta$  AK wurden von der Firma Probiodrug AG, Halle/Saale zur Verfügung gestellt. Sie wurden durch Immunisierung von C57Bl6-Mäusen mit einem Hexapeptid aus dem N-Terminus von pE-A $\beta$  (Sequenz pEFRHDS) generiert. Diese vier monoklonalen AK besitzen verschiedene IgG-Subtypen: Klon K6 (IgG1), Klon K17 (IgG2b), Klon K24 (IgG1), Klon F8 (IgG3). Vergleichend wurde ein pE-A $\beta$ -Antikörper der Firma Synaptic Systems (Klon 2-48) vom Subtyp IgG1 verwendet.

Der Synaptic Systems AK ist in seiner Eignung zur Visualisierung von pE-A $\beta$  gut bekannt und dient als Vergleichsparameter für die neuen AK. Für die vier neuen AK liegen noch keine Erkenntnisse bezüglich des Färbeverhaltens vor. Deswegen diente eine zuvor durchgeführte Verdünnungsreihe, innerhalb dieser Studie, als Richtwert für die nachfolgenden Versuche.

Die einzelnen AK sind in den jeweiligen Kapiteln näher in ihren Eigenschaften beschrieben.

#### 3.2 Transgene Tg2576-Mäuse

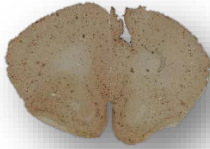



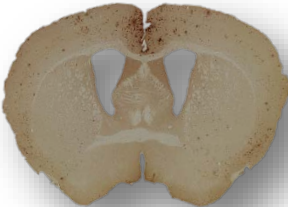


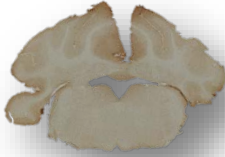

Zur Untersuchung der Anfärbbarkeit bezüglich pE-A $\beta$ -Peptid der fünf AK, wurden transgene Mäuse des Stammes Tg2576 verwendet. Diese exprimieren humanes APP der neuronalen Isoform mit 695 Aminosäuren mit der sogenannten schwedischen Doppelmutation KM670/671NL. Diese Mutation sorgt dafür, dass APP ein besseres Substrat für die amyloidogene Prozessierung ist und verstärkt A $\beta$  gebildet wird. Tg2576-Mäuse entwickeln ab einem Alter von 11 bis 13 Monaten Alzheimer-typische Amyloidablagerungen im Neokortex und im Hippocampus. Als Kontrollen wurden gleichaltrige Wurfgeschwister, die das Transgen nicht exprimieren, verwendet. Für diese Versuchsreihe wurden Mäuse im Alter von 16, 18 und 21 Monaten gewählt. Pro Altersstufe wurden zwei transgene Mäuse und ein Wildtyp-Tier untersucht. Mit Hilfe einer Probefärbung aller vorhandenen Tiere, wurden die mit dem geringsten Gefäßhintergrund und somit mit dem voraussichtlich besten Färbeergebnissen ausgewählt. Weitere Information sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Durch ungleichmäßige Perfusion und Fixierung der Gehirne kann es zu einer unerwünschten Färbung von Blutgefäßen kommen, wodurch die Quantifizierung von Plaques erschwert wird. Um dies zu vermeiden wurden die Gehirne von 13 Mäusen hinsichtlich dieses Kriteriums mittels Immunhistochemie mit dem pE-A $\beta$ -AK von Synaptic Systems untersucht und anschließend ausschließlich Tiere ohne oder mit sehr geringem Gefäßhintergrund verwendet.

Um einen umfassenden Überblick der Verteilung der Plaques des transgenen Tieres zu bekommen, wurden neun Hirnregionen gewählt, welche sich in verschiedenen Ebenen vom präfrontalen Kortex bis zum Kleinhirn befinden. Somit ist ein komplettes Gehirnscreening der transgenen Mäuse ermöglicht worden. Die detaillierten Beschreibungen dieser Regionen sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Als Grundlage diente der Atlas „Paxinos and Franklin’s the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“.

Die Negativkontrollen in Wildtyp-Mäusen wurden in zwei Regionen, dem präfrontalen Cortex und dem Hippocampus durchgeführt. Die Negativkontrollen dienen der Demonstration der Spezifität des jeweiligen AK, denn Wildtyp-Mäuse besitzen kein pE-A $\beta$ -Peptid und somit dürfte es zu keiner Reaktion kommen. Diese Kontrolle wurde bei jeder Färbung mitgeführt, um jeden einzelnen Färbegang qualitativ einschätzen zu können.



*Tabelle 1: Darstellung der neun ausgewählten Schnittebenen.*

Schnittebene	Bildbeispiel	Schnittebene	Bildbeispiel
1 Präfrontaler Kortex		6 Hippocampus posterior	
2 Basales Vorderhirn		7 Locus coeruleus anterior	
3 anteriore Kommissur		8 Locus coeruleus posterior	
4 Nucleus basalis		9 kaudaler Hirnstamm	
5 Hippocampus anterior		<u>2 mm</u>	

### 3.3 Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie

Die Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und anschließend 25 ml PBS gefolgt von 25 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M PB-Puffer perfundiert. Danach wurden die Gehirne präpariert und für 18 Stunden in 4% PFA in 0,1 M PB-Puffer bei 4°C gelagert. Zum Gefrierschutz wurden die Gehirne für drei Tage in 30%ige Saccharoselösung überführt. Es wurden 30 µm dicke Gewebeschnitte am Gefrierschlittenmikrotom (Leica, LS 2000, Wetzlar, Deutschland) angefertigt, die in 0,1 M PB-Puffer mit 0,025% NaN<sub>3</sub> (pH 7,4 ) bei 4°C gelagert wurden.

### 3.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Die immunhistochemischen Markierungen erfolgten an frei schwimmenden Hirnschnitten. Zu Beginn wurden alle Schnitte einem Waschschrift mit PB-Puffer unterzogen um sie vom Natriumazid der Konservierungslösung zu befreien. Des Weiteren wurde eine Inkubation in 60% Methanol und 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (bei Fluoreszenz nur 60 % Methanol) durchgeführt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sorgt für eine Inaktivierung endogener Peroxidasen, die den Färbevorgang stören könnten. Um eine Fehlbindung der AK an unspezifischen AK-Bindestellen zu vermeiden wurden die Präparate 30 min in einer Blockierlösung geschwenkt, die aus Ziegennormalserum und 0,3 % TritonX-100 in 0,1 M Tris-gepuffertem Kochsalz (TBS) besteht. Die Inkubation im jeweiligen primären AK erfolgte über Nacht bei 4°C.

#### 3.4.1 Visualisierung mittels DAB

Die Darstellung der Plaques erfolgte mit der Diaminobenzidin (DAB)- Färbung. Nach der Inkubation im jeweiligen primären AK wurde dieser sorgfältig durch mehrmaliges Waschen in TBS entfernt um unspezifische Färbungen des sekundären AKs zu vermeiden. Der jeweils zum primären AK spezifische, Biotin-konjugierte Sekundärantikörper (Siehe Tabelle 4) wurde mit Hilfe von TBS und 2% Rinderserum-Albumin (BSA) in Lösung gebracht. Im Anschluss an eine 60 minütige Verweildauer, wurde ein erneuter Waschschrift durchgeführt. Diese 60 minütige Dauer genügt, damit der sekundäre AK alle am Schnitt gebundenen primären AK aufsuchen und mit ihnen eine Bindung eingehen kann.

Es wurde ein biotinylierter sekundärer AK verwendet. Durch das Hinzufügen einer Avidin gekoppelten Peroxidase, die mit hoher Affinität am Biotin des sekundären AK bindet, findet mit Hilfe von DAB eine Farbreaktion statt (Siehe Abb. 2). Dazu wurden die Präparate in 4 mg

DAB, gelöst in 5 ml Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,6) und 2,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4 min lang unter schwenken inkubiert. Erst jetzt wurde, durch die dem AK angeheftete Peroxidase, das Antigen durch eine Braunfärbung sichtbar.

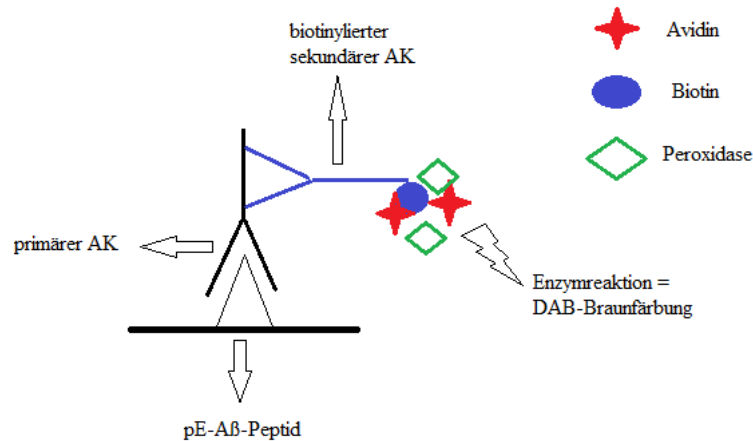


Abbildung 2: Darstellung des Färbeprozesses mittels DAB-Färbung. Das zu erkennende Antigen wird durch eine Braunfärbung sichtbar gemacht, welche durch die Peroxidase katalysiert wird.

Um die Präparate zu konservieren und für das Mikroskopieren vorzubereiten, wurden sie auf Objektträger aufgezogen und mittels Entellan auf Toluolbasis mit einem Deckgläschen fixiert.

Um die Spezifität der Färbung zu verifizieren, wurden zu jeder DAB-Färbung Negativkontrollen mitgeführt. Durch Weglassen des primären AK konnte die spezifische Bindung des sekundären AK am passenden primären AK bewiesen werden. Weiterhin wurden nicht zueinander passende primäre und sekundäre AK kombiniert um die Spezifität des sekundären AK zum primären AK zu demonstrieren. Auch die Testung an Wildtyp-Schnitten, die keine pE-Aβ-Plaques aufweisen, dienten zum Nachweis der Spezifität der jeweiligen AK. Die Negativkontrollen wurden bei jeder Färbung gründlich untersucht und ausgewertet.

### 3.4.2 Doppelmarkierungen mittels Immunfluoreszenz

Um die Färbung der verschiedenen AK genauer interpretieren zu können, wurden Doppelmarkierungen aller AK untereinander durchgeführt. Dies war möglich obwohl alle AK aus der Maus stammen, jedoch die meisten AK verschiedene IgG Klassen besitzen. Die Vorbereitung der Schnitte erfolgte, wie oben beschrieben. Die Visualisierung wurde mittels Biotin-konjugierten primären AK und Carbocyanin (Cy) 2 oder 3 markierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper erreicht. Nach 60 min Inkubation im Dunkeln wurden die Präparate

einem Waschschrift unterzogen und konnten wie die DAB-Schnitte auf einem Objektträger konserviert werden. Jedoch wurden diese unter Dunkelheit bei 4°C gelagert um ein Ausbleichen zu verhindern. Durch diese Doppelmarkierung, ist es möglich auf einem Schnitt zwei AK gleichzeitig zu betrachten und einen direkten Vergleich ihrer Färbungen herzustellen (Siehe 4.5 Doppelimmunfluoreszenz).

Sowohl für DAB-Färbungen, als auch für Immunfluoreszenz, wurden durch das Weglassen des primären AK und durch das Färben eines Wildtyp-Schnittes auf unspezifische Reaktionen geprüft.

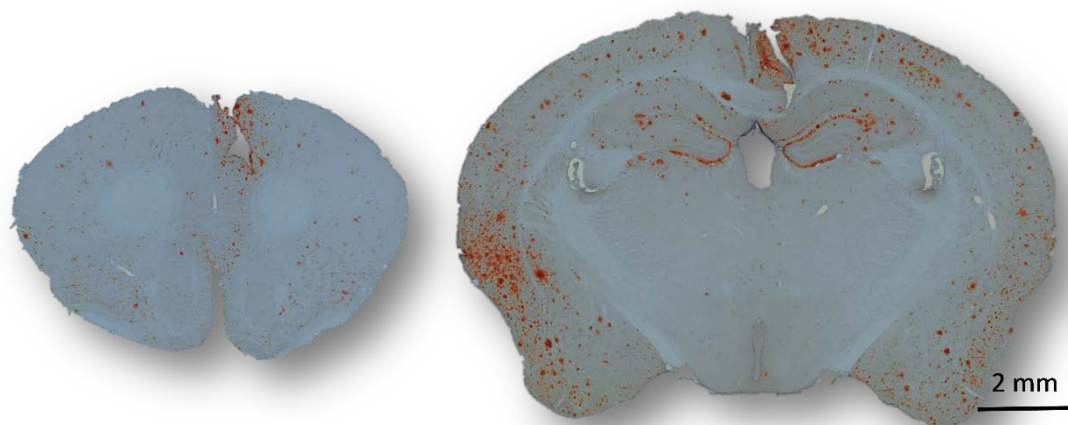
### 3.5 Mikroskopie

#### 3.5.1 Digitalmikroskopie

Die Präparate wurden mit Hilfe des Keyence BZ-9000E Mikroskops untersucht. Es erfolgte eine Aufnahme jedes einzelnen Präparates in einer Komplettaufnahme. Weiterhin wurden ausgewählte Schnitte mit 20er und 40er Objektiven aufgenommen.

#### 3.5.2 Quantifizierung der Plaquefläche

Die Quantifizierung der gefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms BZ-II-Analyzer des Digitalmikroskops Keyence. Durch eine Aufnahme des kompletten Schnittes konnte anhand dessen die Plaquefläche bestimmt werden.



*Abbildung 3: Analyse der Plaquefärbung in Maushirnschnitten mithilfe der Analyse-Software. Rot markiert stellen sich die Plaques identifizierten Flächen dar. Als Beispiel ist links die Schnittebene 1 und rechts die Schnittebene 4 eines 21 monatigen Tieres gewählt.*

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Gehirngewebes

Insgesamt wurden in dieser Studie 13 Tiere des Stammes Tg2576, sieben transgene und sechs Wildtyp-Mäuse untersucht. Diese exprimieren humanes APP der neuronalen Isoform mit 695 Aminosäuren mit der sogenannten schwedischen Doppelmutation KM670/671NL. Diese Mutation sorgt dafür, dass APP ein besseres Substrat für die amyloidogene Prozessierung ist und verstärkt A $\beta$  gebildet wird. Tg2576-Mäuse entwickeln ab einem Alter von 11 bis 13 Monaten Alzheimer-typische Amyloidablagerungen im Neokortex und im Hippocampus.

Durch ungleichmäßige Perfusion und Fixierung der Gehirne kann es zu einer unerwünschten Färbung von Blutgefäßen kommen, wodurch die Quantifizierung von Plaques erschwert wird. Um dies zu vermeiden wurden die Gehirne von 13 Mäusen hinsichtlich dieses Kriteriums mittels Immunhistochemie mit dem pE-A $\beta$ -Antikörper von Synaptic Systems untersucht (Siehe Abb. 4) und anschließend ausschließlich Tiere ohne oder mit sehr geringem Gefäßhintergrund verwendet.

Für die vergleichenden immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils zwei transgene Tiere und ein Wildtyp-Tier pro Altersstufe ausgewählt (Tabelle 2).

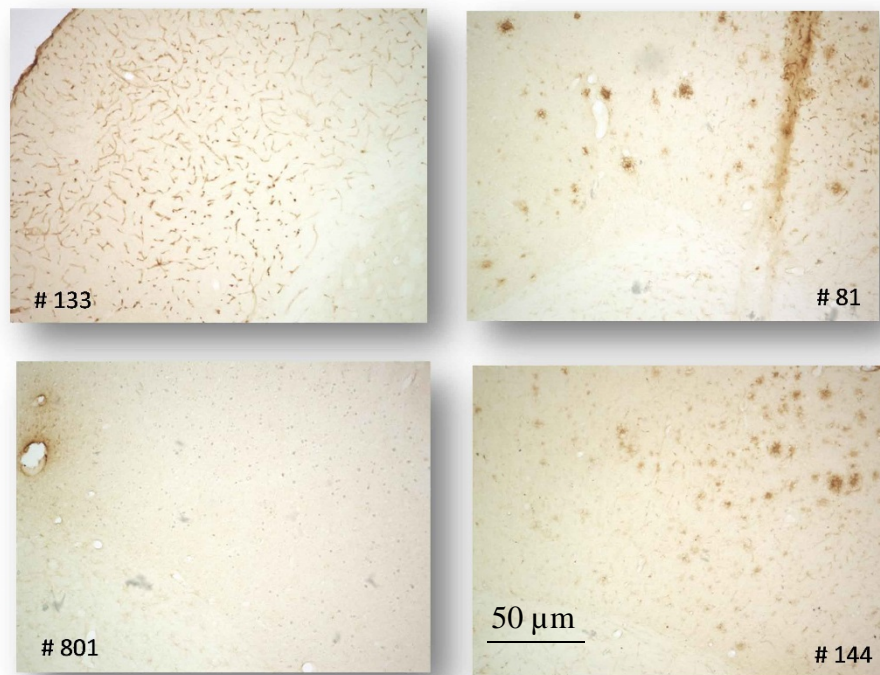
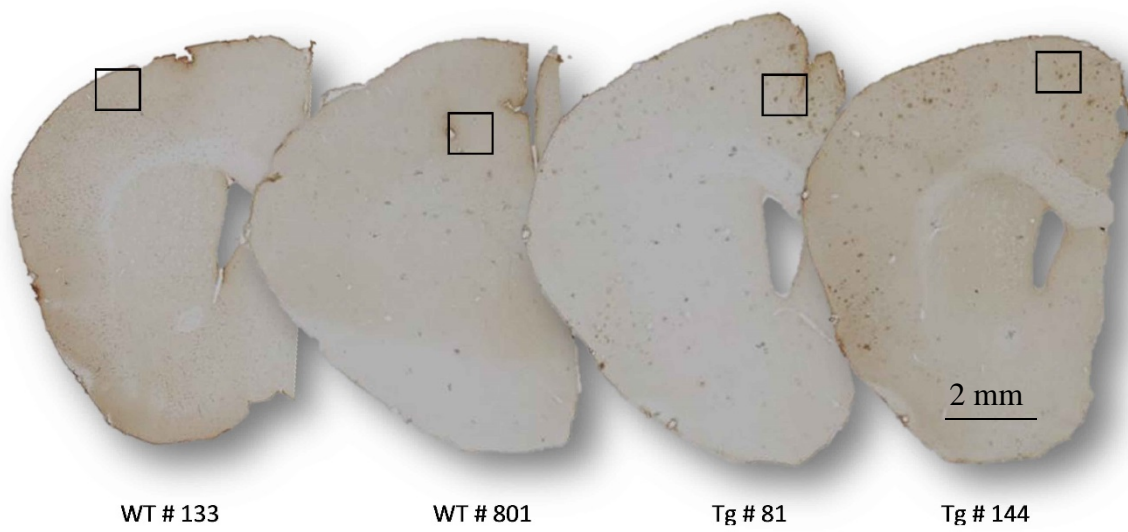


Abbildung 4: Darstellung des Gefäßhintergrundes anhand von Hirnschnitten ausgewählter Tiere. Wildtyp-Mäuse (WT) und transgene Mäuse von Tg2576 (Tg) wurden auf ihren Gefäßhintergrund untersucht. Nur Tiere, die einen geringen Gefäßhintergrund aufwiesen, wurden für weitere Versuche verwendet.

*Tabelle 2: Auswahl der Tiere für die folgende Studie am Mausmodell.*

Bezeichnung	Stamm	Alter	Auswahl
Tier # 801	WT v. tg2576	27 Monate	Nein
Tier # 78	tg2576	21 Monate	Ja
Tier # 81	tg2576	21 Monate	Nein
Tier # 98	tg2576	21 Monate	Ja
Tier # 144	tg2576	18 Monate	Ja
Tier # 153	tg2576	18 Monate	Ja
Tier # 133	WT v. tg2576	19 Monate	Ja
Tier # 134	WT v. tg2576	19 Monate	Nein
Tier # 464	WT v. tg2576	18 Monate	Ja
Tier # 193	tg2576	16 Monate	Ja
Tier # 195	tg2576	16 Monate	Ja
Tier # 191	WT v. tg2576	16 Monate	Ja
Tier # 194	WT v. tg2576	16 Monate	Nein

#### 4.2 Darstellung von pE-A $\beta$ -Ablagerungen mit fünf verschiedenen Antikörpern

Es wurden zunächst Testreihen angefertigt um die Eignung der neuen monoklonalen primären pE-A $\beta$ -AK zu untersuchen. Es wurde eine Versuchsreihe angefertigt, um die immunhistochemischen Färbungen der vier neuen monoklonalen pE-A $\beta$ -AK an Mäusegewebe zu testen und diese mit dem etablierten Synaptic Systems AK zu vergleichen. Die Testreihe zeigte erwartungsgemäß, dass der Synaptic Systems pE-A $\beta$ -AK, aber auch die neuen AK K6, K17 und F8 eine gute, jedoch auch unterschiedlich intensive Plauefärbung erbrachten. Der AK K24 wurde aus den weiteren Versuchsreihen ausgeschlossen, da keine Plauefärbung nachweisbar war. Die unterschiedlichen Intensitäten sind in Abb. 5 dargestellt.



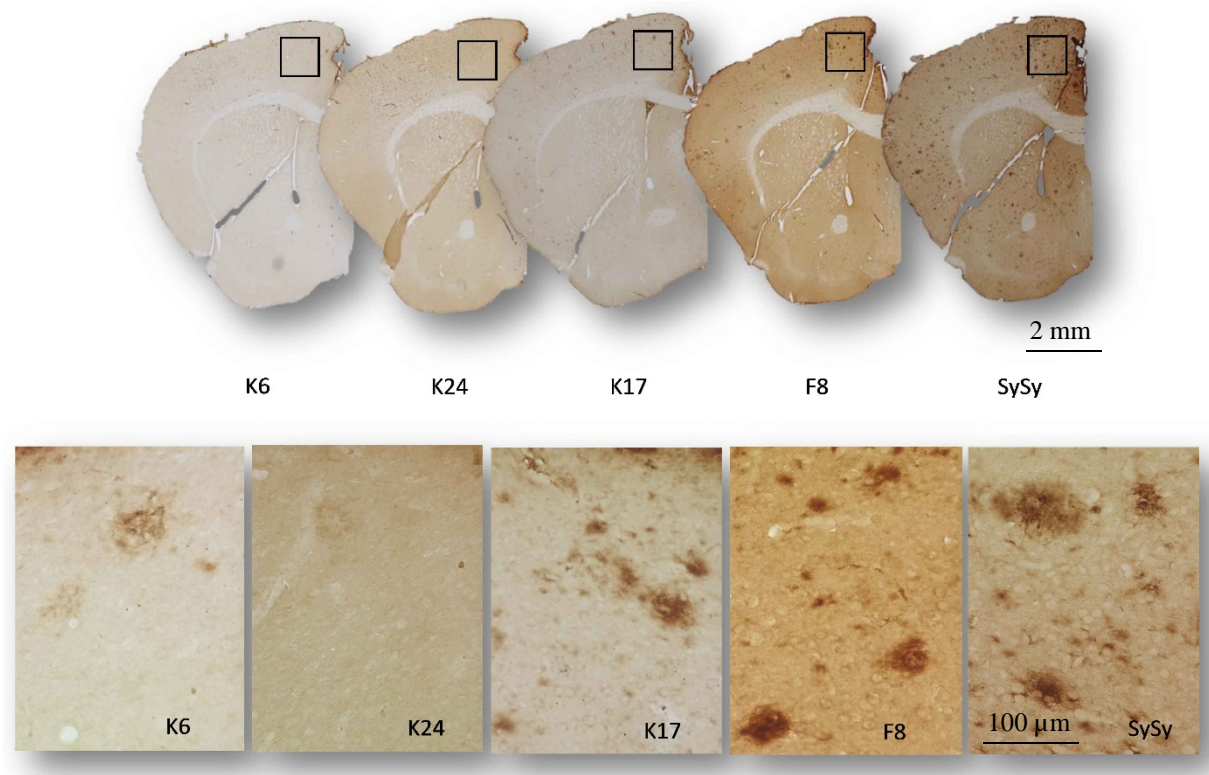


Abbildung 5: Analyse der unterschiedlichen Färbintensitäten aller getesteten Antikörper im Vergleich. K6 hat eine geringe Farbintensität, während K24 nur Schatten färbt und die Plaques nicht sichtbar werden. Eine in etwa vergleichbare Intensität von K17 und F8 wird durch die gezeigten Plaques deutlich. Synaptic Systems (SySy) weist die größte Plaquesfläche nach..

#### 4.3 Verdünnungsreihen der primären pE-A $\beta$ -Antikörper

Die verwendete Konzentration eines AK kann die Intensität der spezifischen Färbung, aber auch die Hintergrundfärbung stark beeinflussen. Wird der AK in einer zu hohen Konzentration eingesetzt, ist das nicht nur Verschwendung von teuren Materialien, sondern es können auch starke unspezifische Färbungen auftreten. Ebenso kann eine abgeschwächte Visualisierung die Folge von zu niedrigen AK-Konzentrationen sein. Deswegen galt es am Anfang, festzulegen, in welchen Konzentrationen die neuen AK eingesetzt werden sollen. Dies ist im Schema Tabelle 3 für das bessere Verständnis illustriert und gilt für alle fünf AK.



Tabelle 3: Schema zur Durchführung der Verdünnungsreihen. Gültig für jeden getesteten Antikörper.

		Sekundärer AK	
		Bio - Ziege anti Maus IgG	
Primärer AK	Maus anti pE-Aβ	Konzentrationen	
		1:200	1:400
		1:100	
		1:250	
		1:500	

Für den bereits in immunhistologischen Färbungen etablierten AK von Synaptic Systems wurde eine Verdünnung von 1:200 gewählt. Für jeden einzelnen neuen AK wurde eine Verdünnungsreihe (1:100; 1:250; 1:500) angefertigt und die Verdünnung bestimmt, welche die beste immunhistochemische Visualisierung der Aβ-Ablagerungen ermöglicht. Dies war für den Klon K6 1:100, für Klon K17 1:250 und für Klon F8 1:250. Kommerziell verfügbare Sekundär-AK gegen Maus-IgGs erkennen entweder alle IgG-Subtypen, oder sind gegen einzelne IgG-Subtypen gerichtet. Um geeignete Sekundär-AK zum Nachweis der pE-Aβ-AK für die Plaque-Darstellung zu identifizieren, wurden verschiedene Verdünnungen (1:200 und 1:400) von nicht-Subtyp-spezifischen und von Subtyp-spezifischen biotinylierten Ziege-anti-Maus IgGs getestet. Dabei zeigte sich, dass in jedem Fall die biotinylierten subtypspezifischen sekundären Ziege anti-Maus AK in einer Verdünnung von 1:200 die geringste Hintergrundfärbung und das deutlichste Signal erbrachten. Deshalb wurden nur diese für die folgenden Versuchsreihen eingesetzt. Die verwendeten subtypspezifischen Sekundär-AK können aus der folgenden Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Darstellung des IgG-Subtyps des entsprechenden Antikörpers.

Maus anti pE Aβ (primärer AK)	Bio - Ziege anti Maus IgG (sekundärer AK)
Synaptic Systems	IgG1
K6	IgG1
K17	IgG2b
F8	IgG3

#### 4.3.1 Antikörper Synaptic Systems

Dieser etablierte, kommerziell verfügbare AK diente als Vergleich für alle neu entwickelten hier untersuchten AK. Eine Verdünnungsreihe wurde nicht angefertigt, da die zu verwendende Konzentration auf Erfahrungen der Mitarbeiter des Paul-Flechsigs-Institutes basiert. Es wurde mit einer Verdünnung des primären AK von 1:200 gearbeitet. Der sekundäre biotinylierte Ziege-anti-Maus-IgG1 wurde ebenfalls in 1:200 eingesetzt.

#### 4.3.2 Antikörper K17

Die K17- Verdünnungsreihe wurde nach dem Schema (Tabelle 3) angefertigt. Eine hohe Verdünnung von 1:500 erbrachte ein schwaches Anfärben der Plaques. Die Verdünnungen 1:100 und 1:250 des primären AK erbrachten keine deutlichen Unterschiede (Abb. 6). Der AK wurde in weiteren Versuchsreihen in der Verdünnung 1:250, in Kombination mit dem Sekundärantikörper Bio-Ziege-anti-Maus-IgG2b eingesetzt, dieser in Verdünnung 1:200. Mit dieser Kombination konnte eine gute Färbung erreicht werden, die auf einen sparsamen Umgang mit dem AK basiert.

#### 4.3.3 Antikörper K6

Aus der Abb. 7 wird ersichtlich, dass man vom AK K6 eine höhere Konzentration benötigt um eine gute Visualisierung der Plaques zu erreichen. Die Verdünnungen 1:500 und 1:250 weisen eine schwächere Färbung auf, als 1:100. Somit wird der AK K6 für weitere Versuchsreihen in der Verdünnung 1:100 eingesetzt. Der Sekundärantikörper bio-Ziege-anti-Maus IgG1 weist in der Verdünnung 1:200 die besten Ergebnisse auf und wurde deswegen in weiteren Versuchsreihen auch in dieser eingesetzt (siehe Tabelle 3).

#### 4.3.4 Antikörper F8

Diese F8-Verdünnungsreihe folgt dem Schema, welches bei den AK zuvor ebenfalls verwendet wurde (Tabelle 3). Der geringe Einsatz des AK in der Verdünnung von 1:500 erbrachte zwar ein Anfärben der Plaques, jedoch ist eine Steigerung der Visualisierung in höheren Konzentrationen deutlich sichtbar. Dieser Unterschied kann zwischen den Verdünnungen 1:100 und 1:250 nicht beobachtet werden, weswegen das Einsetzen des primären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:250 ökonomisch gerechtfertigt ist (siehe Abb. 8). Als Sekundärantikörper wurde der bio-Ziege-anti-Maus IgG3 verwendet, der die besten Ergebnisse in einer Verdünnung von 1:200 erzielte. Aus jedem Färbevergleich wird ersichtlich, dass eine Verdünnung von 1:400 des Sekundärantikörpers zu einer schlechteren Visualisierung führt.

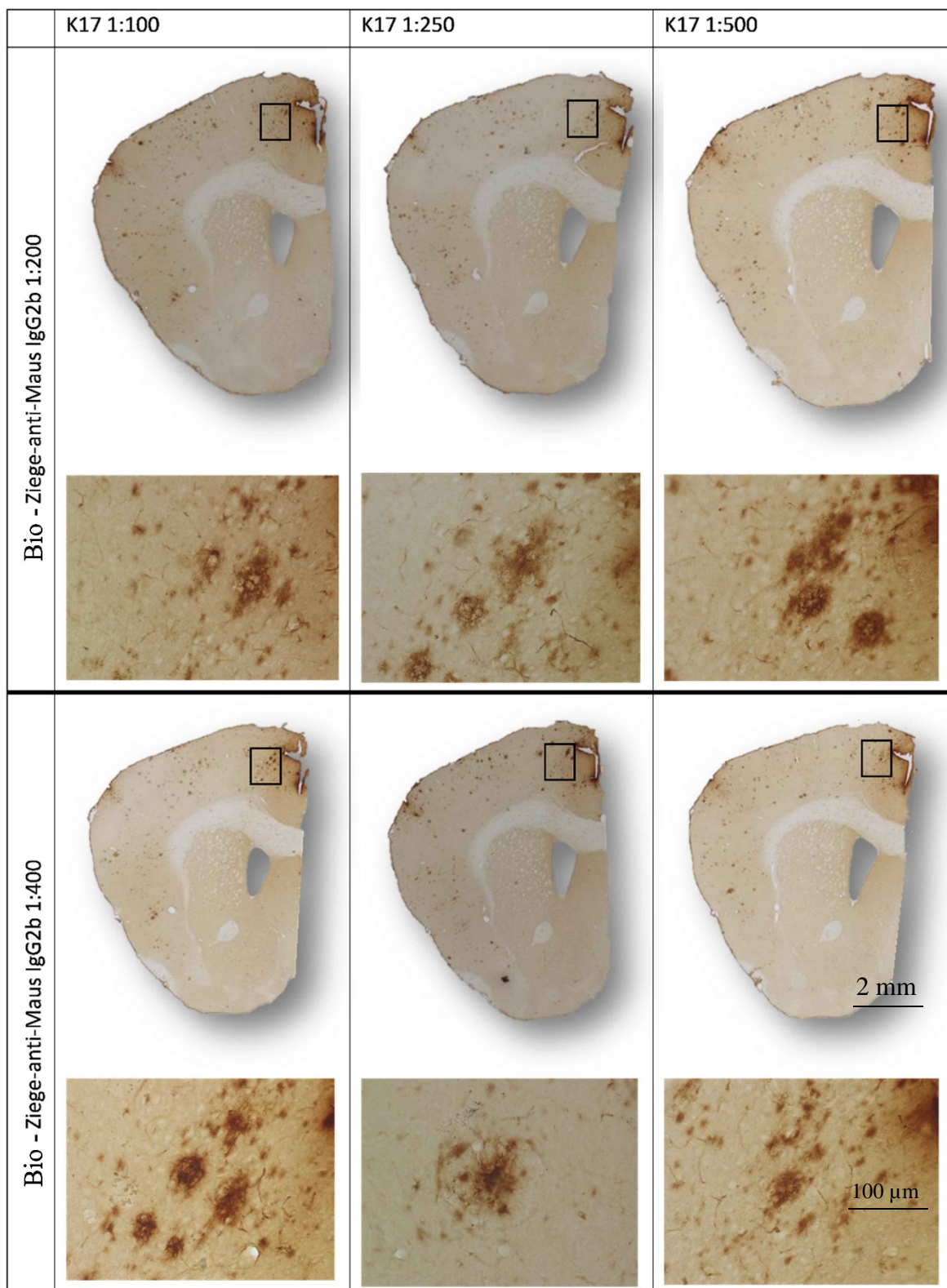


Abbildung 6: Analyse der Ablagerungen in Hirnschnitten mit dem Antikörper K17, der in verschiedenen Verdünnungen zur Visualisierung eingesetzt wurde.


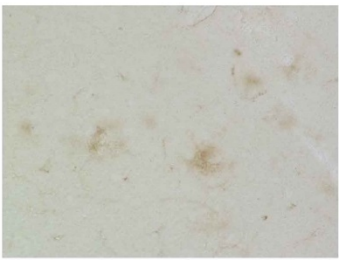



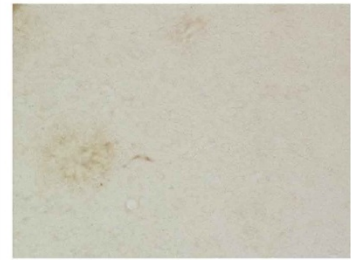


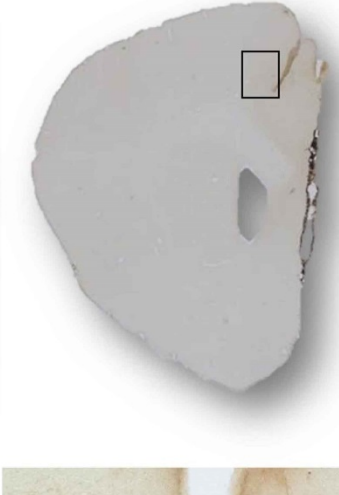

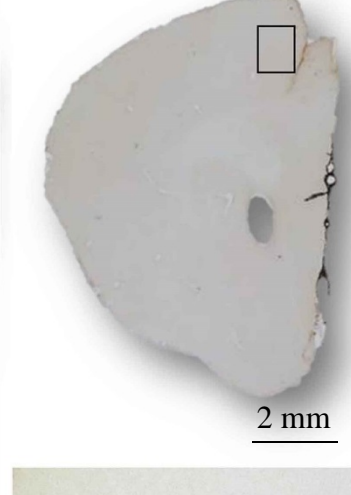
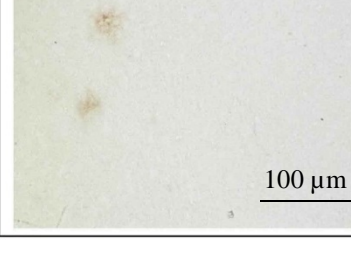
	K6 1:100	K6 1:250	K6 1:500
Bio - Ziege-anti-Maus IgG1 1:200	 	 	 
Bio - Ziege-anti-Maus IgG1 1:400	 	 	 

Abbildung 7: Analyse der Ablagerungen in Hirnschnitten mit dem Antikörper K6, der in verschiedenen Verdünnungen zur Visualisierung eingesetzt wurde.



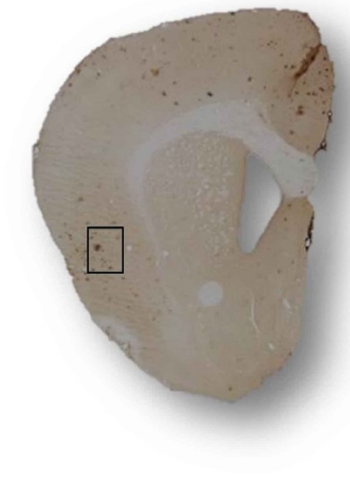
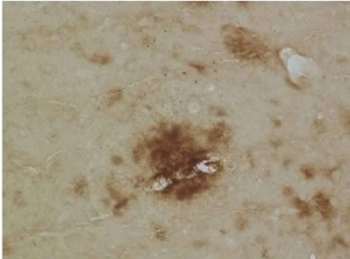

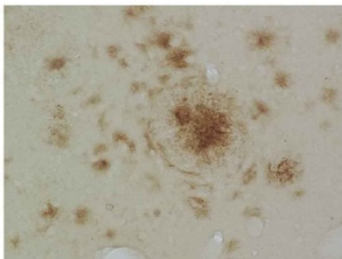

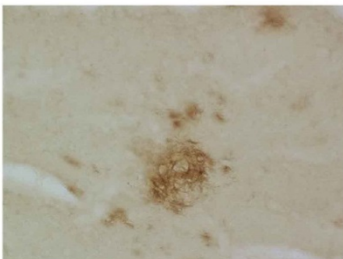

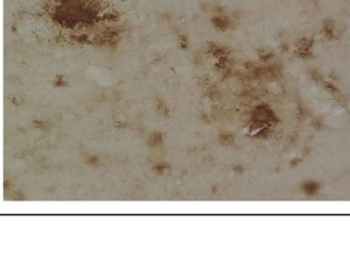

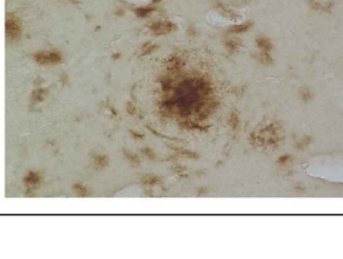
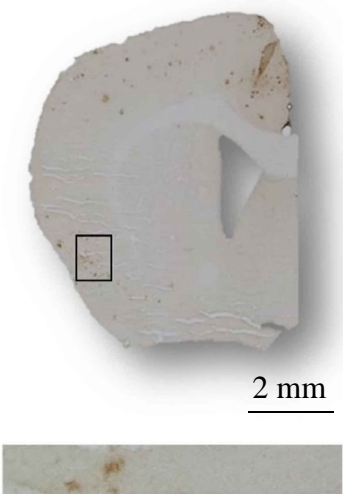
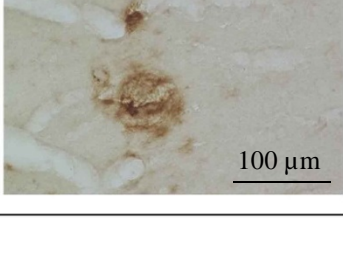
	F8 1:100	F8 1:250	F8 1:500
Bio - Ziege-anti-Maus IgG3 1:200	 	 	 
Bio - Ziege-anti-Maus IgG3 1:400	 	 	 

Abbildung 8: Analyse der Ablagerungen in Hirnschnitten mit dem Antikörper F8, der in verschiedenen Verdünnungen zur Visualisierung eingesetzt wurde.

#### 4.4 Quantifizierung der A $\beta$ -Plaque-Beladung

Um die Plaque-Beladung in definierten Hirnstrukturen APP-transgener Tg2576-Mäuse zu quantifizieren, wurden für jeden der vier untersuchten pE-A $\beta$ -AK (Synaptic Systems, K6, K17 und F8) in drei Altersstufen (16, 18 und 21 Monate) in neun verschiedenen koronalen Schnittebenen immunhistologische Färbungen durchgeführt. Die Schnittebenen befanden sich auf Ebenen, die folgende Strukturen enthalten: 1 Präfrontaler Kortex, 2 Basales Vorderhirn, 3 anteriore Kommissur, 4 Nucleus basalis, 5 Hippocampus anterior, 6 Hippocampus posterior, 7 Locus coeruleus anterior, 8 Locus coeruleus posterior, 9 kaudaler Hirnstamm. Dies ermöglicht es, viele verschiedene Hirnregionen bezüglich der Ablagerung von pE-A $\beta$  zu untersuchen. Außerdem bekommt man einen guten Überblick, in welchen Arealen und zu welchem Zeitpunkt sich die meisten Plaques bilden. Es wurden für jede Hirnregion (Tabelle 1) die aufeinanderfolgenden Schnitte ausgewählt, sodass ein Maximalabstand von 120  $\mu$ m unter den AK besteht, da ein Schnitt eine Dicke von 30  $\mu$ m aufweist. Im Allgemeinen kann ein quantitativer Anstieg der Plaque-Beladung mit steigendem Alter verzeichnet werden. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms BZ-II-Analyzer einer Analysesoftware des Digitalmikroskops Keyence und ist in den folgenden Tabellen festgehalten.

Die Werte ergeben sich als Mittelwert der jeweiligen zwei Tiere einer Altersstufe. Des Weiteren ist die Standardabweichung in jedem Diagramm mit aufgeführt.

#### 4.4.1 Antikörper von Synaptic Systems



Abbildung 9: Analyse der A $\beta$ -Plaque-Beladung in allen Schnittebenen mittels Synaptic Systems Antikörper.

Anhand der Quantifizierung der Plaquefläche wird deutlich, dass mit steigendem Alter die A $\beta$ -Plaques zunehmen. Jedoch trifft diese Aussage nicht auf den präfrontalen Cortex (Hirnregion1) zu. Dort findet sich in den jüngsten Tieren die höchste Plaque-Beladung im Vergleich zu den anderen Schnittebenen. Diese nimmt im zunehmenden Alter nicht zu. In den anderen Hirnregionen des Großhirns (Region zwei bis sechs) ist eine deutliche Zunahme der Plaquefläche mit 21 Monaten zu registrieren. Im Cerebellum (Hirnregionen sieben bis neun) wurden immunhistochemisch keine A $\beta$ -Plaques erkennbar (siehe Abb. 10).

Als visualisiertes Gehirnscreening zu diesem AK wurde das der 21 monatigen Tiere gewählt, da hier die Plaques am besten abzugrenzen sind (siehe Abb. 9).

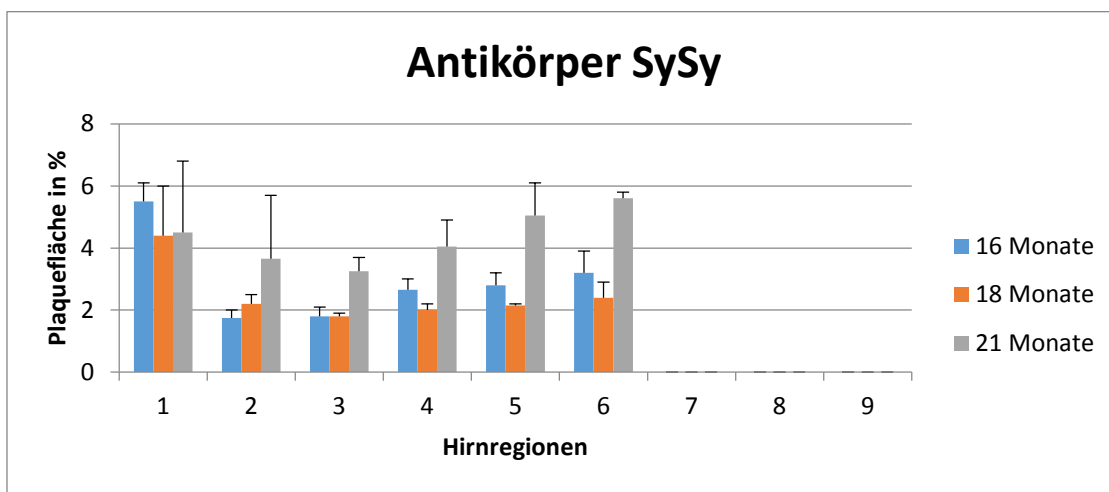


Abbildung 10: Darstellung der visualisierten Plaquefläche in % des Gesamtschnittes, anhand der verschiedenen Schnittebenen zu verschiedenen Lebenszeiten mit dem Synaptic Systems Antikörper.



#### 4.4.2 Antikörper K17

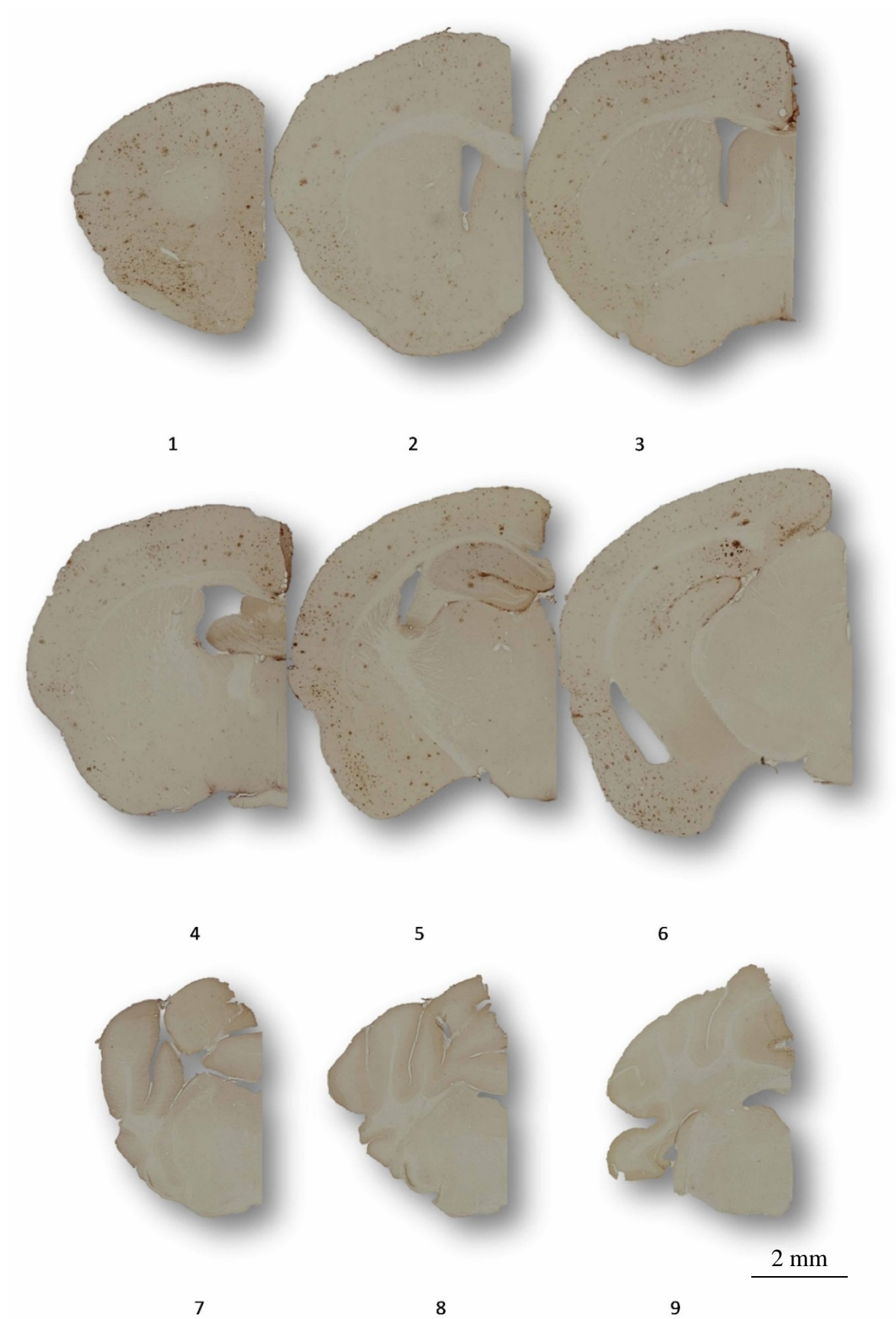


Abbildung 11: Analyse der A $\beta$ -Plaque-Beladung in allen Schnittebenen mittels K17 Antikörper.

Dieser AK zeigt ebenfalls einen Anstieg der Plaquefläche mit höherem Alter. Im Vergleich zum Synaptic Systems AK trifft dies aber auch auf die frühere Altersstufe (16 Monate) zu. Des Weiteren wird ebenfalls gezeigt, dass das Cerebellum (Hirnregionen sieben bis neun) keine A $\beta$ -Plaques aufweist. Der Unterschied zwischen 16 und 18 Monaten ist gering ausgeprägt, erst mit 21 Monaten ist ein signifikanter Anstieg der Plaquefläche zu verzeichnen (siehe Abb. 12).

Die Bilderreihe dieses AK zeigt eine etwas geringere Färbung, als die des Synaptic Systems AK. Jedoch sind die Plaques klar abgrenzbar und deutlich zu erkennen. Es wurde ebenfalls die 21 monatige Altersstufe zur beispielhaften Visualisierung genutzt (siehe Abb. 11).

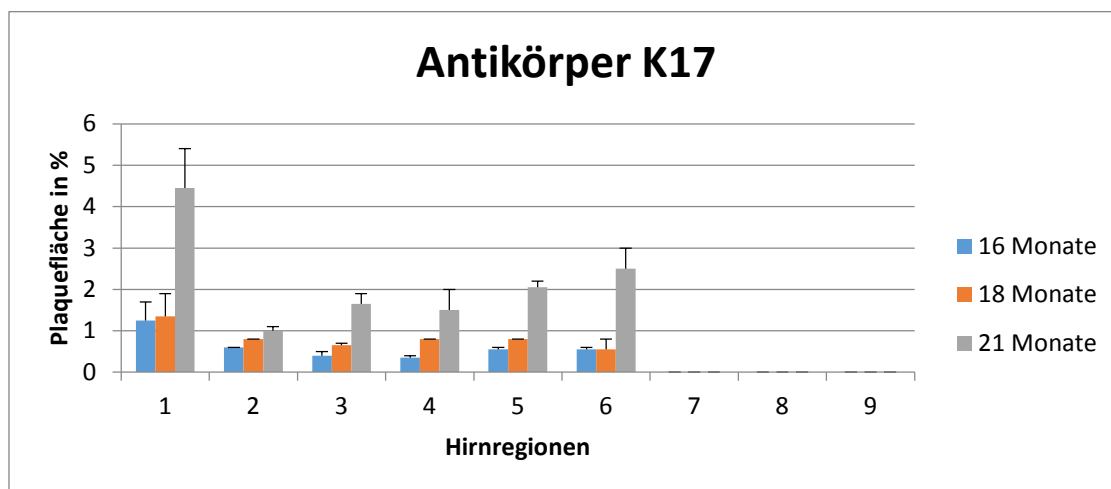


Abbildung 12: Darstellung der visualisierten Plaquefläche in % des Gesamtschnittes, anhand der verschiedenen Schnittebenen zu verschiedenen Lebenszeiten mit dem Antikörper K17.

#### 4.4.3 Antikörper K6

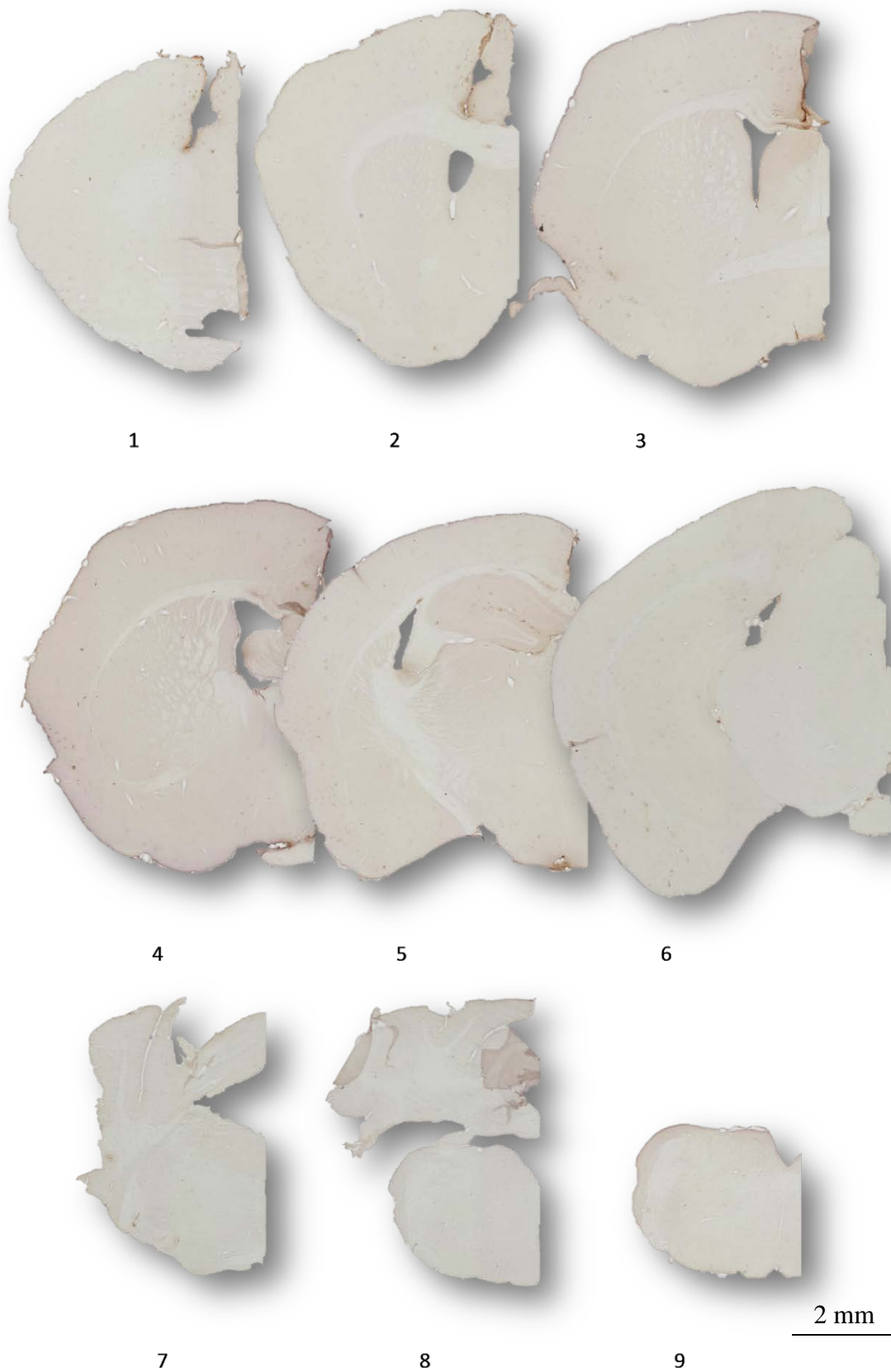


Abbildung 13: Analyse der A $\beta$ -Plaque-Beladung in allen Schnittebenen mittels K6 Antikörper.

Dieser AK zeigt die geringste Plaquemarkierung aller AK. Trotz dessen ein Anstieg im Alter zu verzeichnen. Es wird weiterhin deutlich, dass die Plaquefläche nicht erst ab 21 Monaten ansteigt, sondern sie kontinuierlich und gleichmäßig im Alter zunimmt. Im Cerebellum sind ebenfalls keine Ablagerungen von A $\beta$ -Peptid nachweisbar (siehe Abb. 14).

In Abb. 13 findet man die für diesen AK beispielhafte Visualisierung des 21 Monate alten Tieres. Im Vergleich zu den anderen Visualisierungen wirken diese heller und die Plaquefläche ist eher spärlich ausgeprägt.

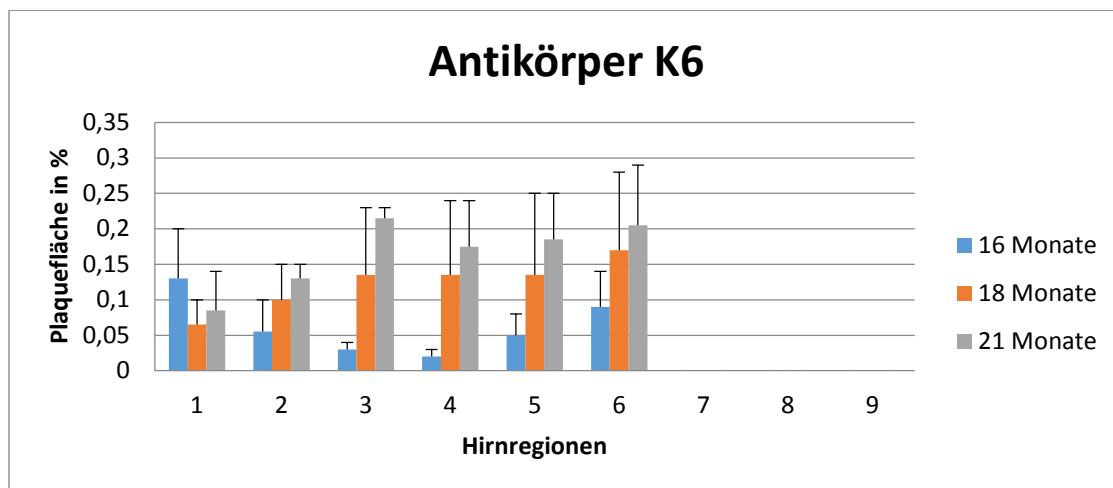


Abbildung 14: Darstellung der visualisierten Plaquefläche in % des Gesamtschnittes, anhand der verschiedenen Schnittebenen zu verschiedenen Lebenszeiten mit dem Antikörper K6.

#### 4.4.4 Antikörper F8

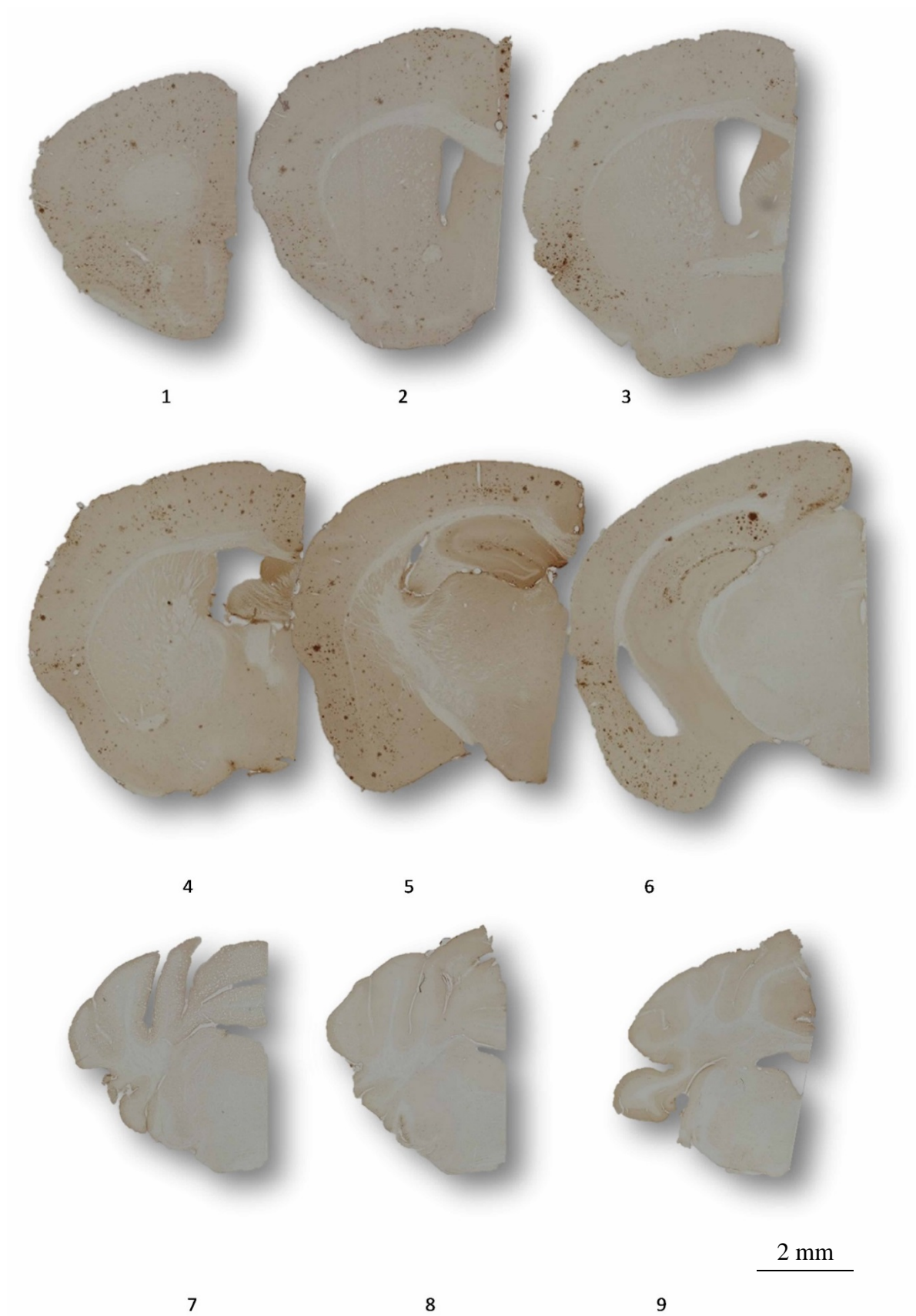


Abbildung 15: Analyse der A $\beta$ -Plaque-Beladung in allen Schnittebenen mittels F8 Antikörper.

Die Abb. 16 fasst die Ergebnisse des AK F8 für die Plaquefläche im Altersgang zusammen. Es wird ersichtlich, dass hier ebenfalls ein Anstieg der Plaquefläche im Alter vorzufinden ist. Der deutlichste Anstieg ist zwischen 18 Monaten und 21 Monaten nachweisbar. Die Plaquefläche steigt teilweise um bis zu 200% im Vergleich zur vorherigen Altersstufe. Wie bei jedem getesteten AK, kann mit dem AK F8 kein A $\beta$ -Plaque im Cerebellum sichtbar gemacht werden.

Wie für die anderen AK diene die älteste Altersstufe zur Visualisierung des Gehirnscreenings und ist in der Abb. 15 zu sehen.

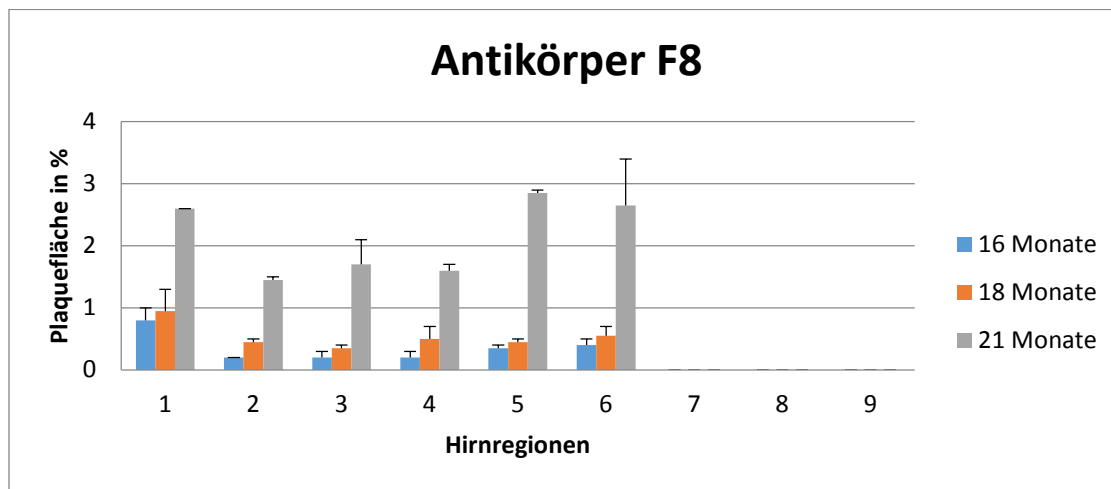


Abbildung 16: Darstellung der visualisierten Plaquefläche in % des Gesamtschnittes, anhand der verschiedenen Schnittebenen zu verschiedenen Lebenszeiten mit dem Antikörper F8.

#### 4.4.5 Direkter Vergleich der verschiedenen Antikörper

Um die verschiedenen AK besser vergleichen zu können, ist die gesamte Plaquefläche der Hirnregionen pro AK einer Altersstufe zusammengefasst. Dieser Wert ist ein Mittelwert der beiden Tiere. Es wird ersichtlich, dass der Synaptic System AK in jeder Altersstufe die größte Plaquefläche erkennt und K6 prozentual die kleinste Fläche visualisiert. K17 und F8 besitzen ein sehr ähnliches Färbemuster.

Die untersuchten Gehirnschnittebenen sind unterschiedlich stark von pE-A $\beta$ -Ablagerungen betroffen. Die am weitesten rostral gelegene Schnittebene mit präfrontalem Kortex weist besonders viele pE-A $\beta$ -Ablagerungen auf, während die darauf folgende Schnittebene deutlich weniger pE-A $\beta$ -Ablagerungen zeigt. Danach gibt es Richtung kaudal wieder eine Zunahme der pE-A $\beta$ -Ablagerungen. In den Schnittebenen 7, 8 und 9 wurden keine pE-A $\beta$ -Ablagerungen nachgewiesen. Jeder AK zeigt jedoch im höheren Alter eine erhöhte Plaquefläche, was mit dem Verlauf der Pathologie und der zunehmenden Symptomatik in diesem Mausmodell korreliert. Zu Beginn ist der präfrontale Cortex von A $\beta$ -Ablagerungen am stärksten betroffen. Erst später entwickeln sich in tieferen Hirnstrukturen vermehrt Plaques. Das Cerebellum (Hirnregionen sieben bis neun) bleibt ohne sichtliche A $\beta$ -Plaque Ablagerungen. Dies geht mit der Pathogenese der AD, bei der keine Kleinhirnsymptome auffallen, einher (Abb. 17, 18 und 19).

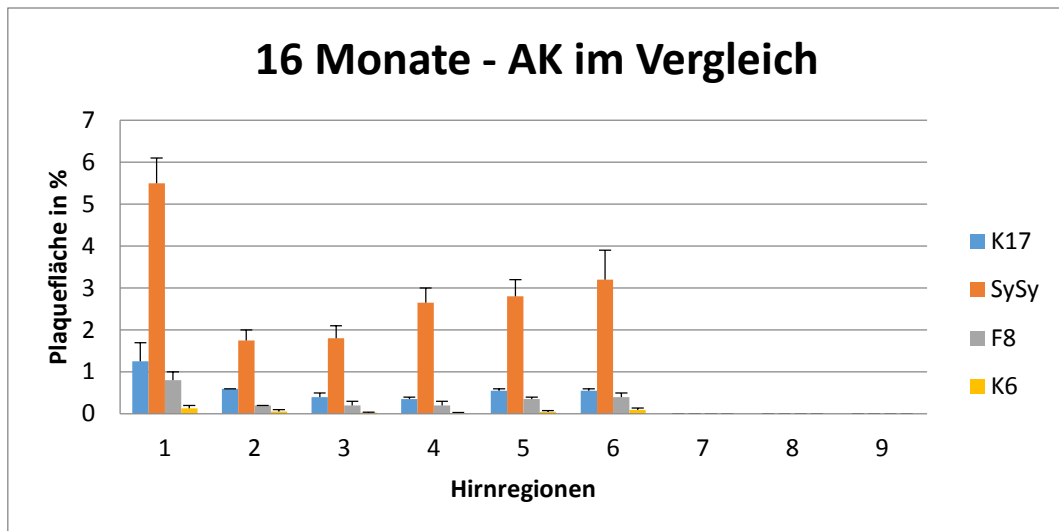


Abbildung 17: Darstellung der Plaquefläche in % der verschiedenen Antikörper im Vergleich beim 16 monatigen Tier.

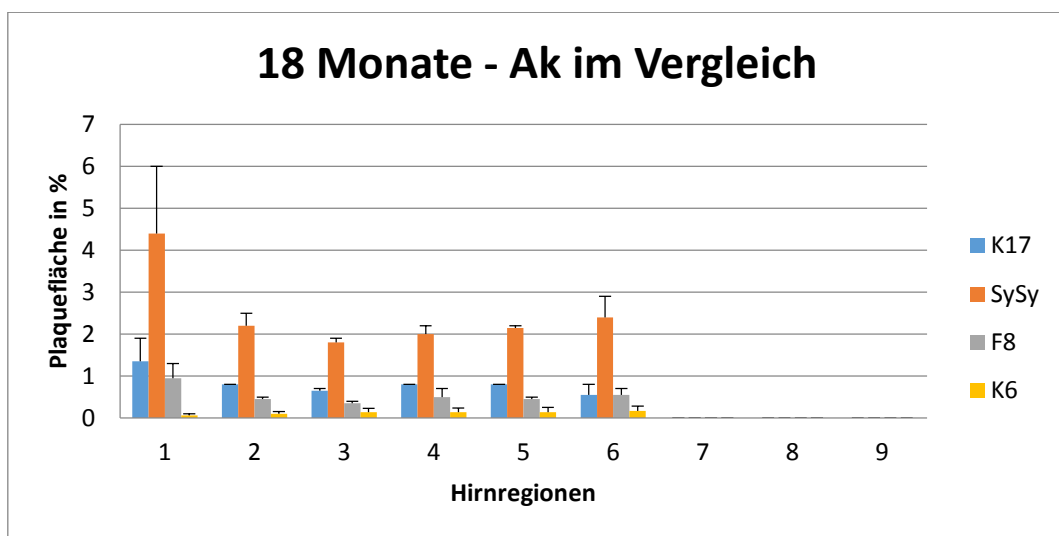


Abbildung 18: Darstellung der Plaquefläche in % der verschiedenen Antikörper im Vergleich beim 18 monatigen Tier.

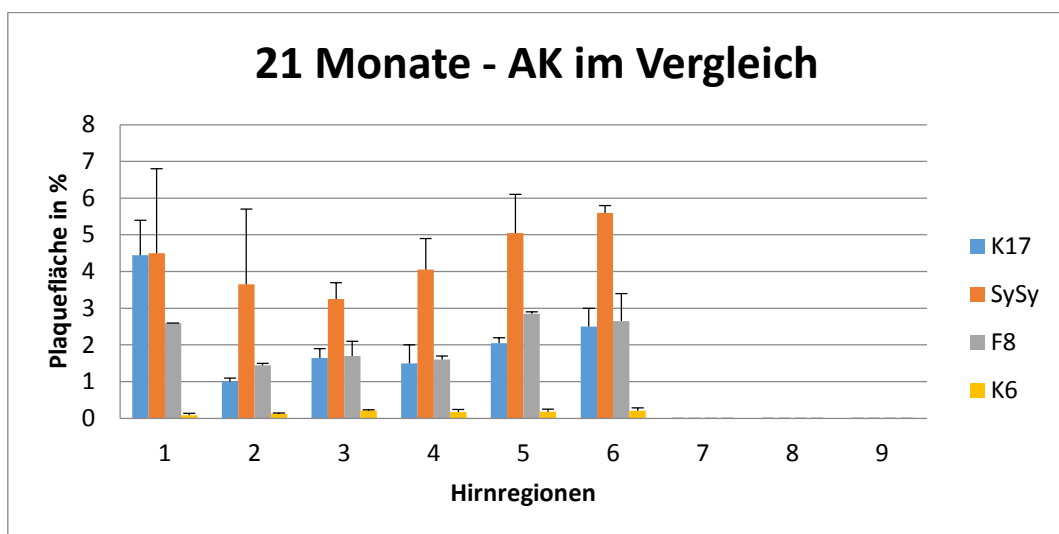


Abbildung 19: Darstellung der Plaquefläche in % der verschiedenen Antikörper im Vergleich beim 21 monatigen Tier.



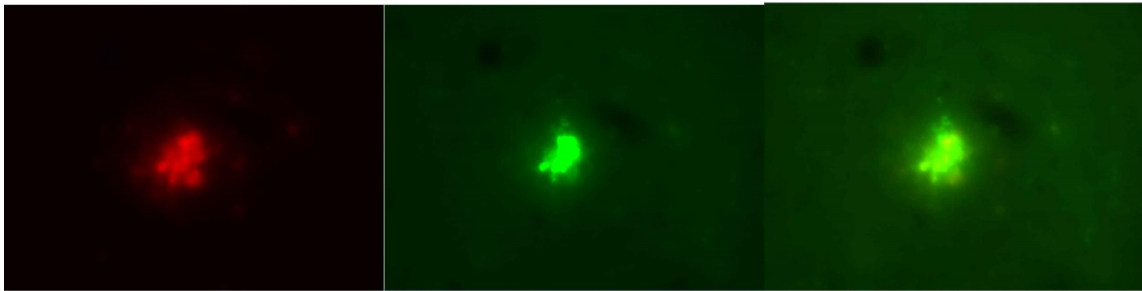
#### 4.5 Doppelimmunfluoreszenz

Um nachzuweisen, ob untersuchten pE-A $\beta$ -AK dieselben Strukturen darstellen, wurde eine Versuchsreihe mit Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen angefertigt. Um nachzuweisen, ob alle Obwohl die primären monoklonalen pE-A $\beta$ -Antikörper alle in der Maus generiert wurden, erlaubten die verschiedenen IgG-Subtypen eine Doppelmarkierung mit Subtypenspezifischen Sekundärantikörpern. Dabei zeigte sich, dass alle pE-A $\beta$ -AK dieselben Anteile von A $\beta$ -Ablagerungen erkennen, denn es konnte zwischen allen AK eine Farbreaktion an den gleichen Orten gezeigt werden.

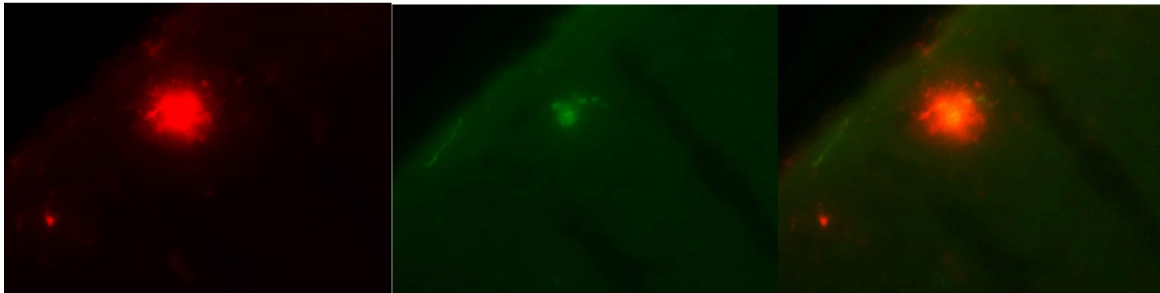
Die Fluoreszenzfärbungen zeigen eine ähnliche Intensität der verschiedenen AK, wie in den DAB-Färbungen. Der Synaptic Systems AK zeigt eine sehr starke Reaktion und ist der AK mit der besten Plaquedarstellung. Dies ist in Abb. 20 vor allem unter Punkt drei und vier zu erkennen, welche Synaptic Systems und AK K17 Rot (Cy3 markiert) und einmal Grün (Cy2 markiert) gekreuzt darstellt. Damit ist bewiesen, dass die Färbeintensität nicht vom sekundären AK und der entsprechenden Cy-Markierung abhängt, sondern, dass der Synaptic Systems AK die meisten Plaques darstellt.

Die AK K17 und F8 zeigen eine sehr ähnliche Intensität bei der Darstellung der Plaques. Diese AK zeigen zwar ein schwächeres Farbsignal als der Synaptic Systems AK, jedoch sind insbesondere die Kernbereiche der Plaques gut darstellbar. Der AK K6 stellt die geringste Plaquefläche in diesem Mausmodell dar. Wie in den DAB-Färbungen sind auch bei der Fluoreszenz nur leichte Plaque-Schatten darzustellen, sodass sich bestätigt, dass der AK K6 für die Färbung von Plaques im Mäusegewebe nicht präferiert werden kann.

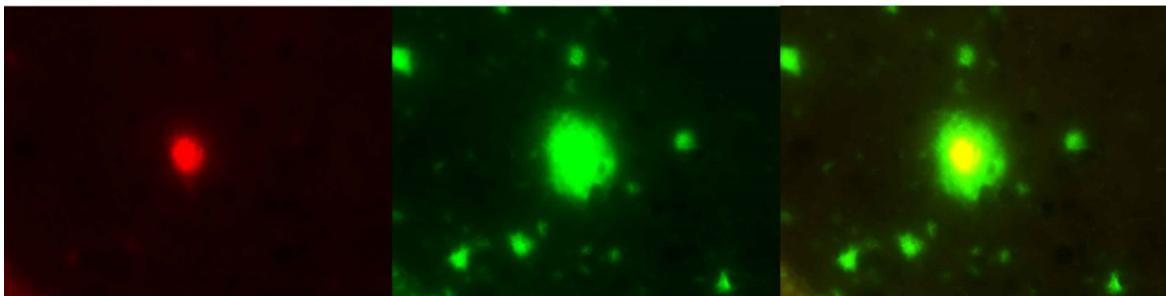
1. K17 Cy3 - F8 Cy2 - Überlagerung beider AK



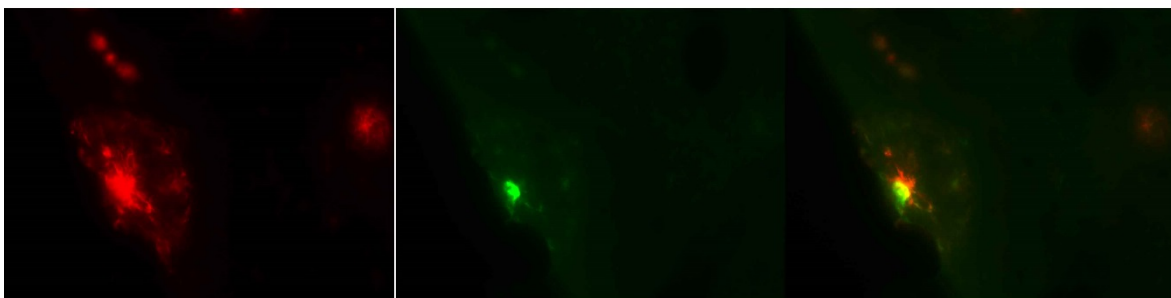
2. Synaptic Systems Cy3 - F8 Cy2 - Überlagerung beider AK



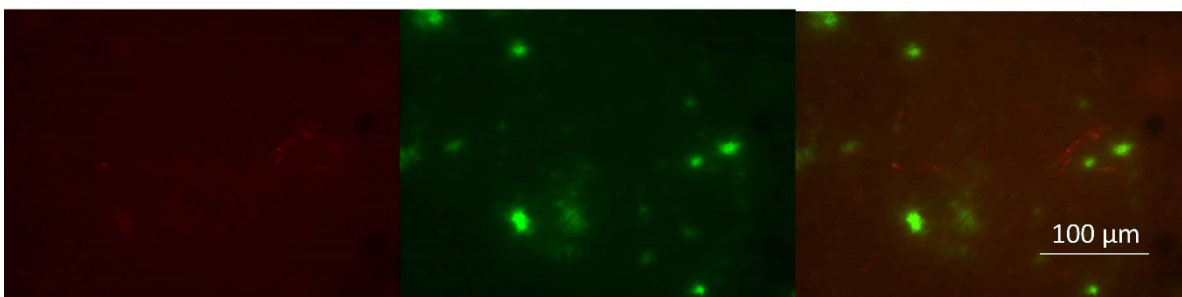
3. K17 Cy3 - Synaptic Systems Cy2 - Überlagerung beider AK



4. Synaptic Systems Cy3 - K17 Cy2 - Überlagerung beider AK



5. K6 Cy3 - K17 Cy2 - Überlagerung beider AK



6.            K6 Cy3            -            F8 Cy2            -            Überlagerung beider AK

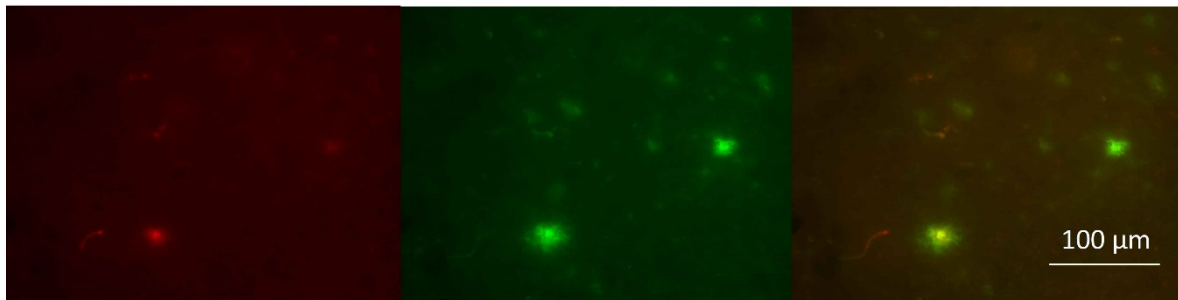


Abbildung 20: Darstellung der Doppel-Fluoreszenzfärbungen der verschiedenen AK. Die Doppelmarkierungen entstammen alle der Schnittebene 1.

#### 4.6 Doppelmarkierung der Antikörper mit dem pan-A $\beta$ -Antikörper 4G8

Der AK 4G8 erkennt alle verschiedenen Varianten der A $\beta$ -Peptide und visualisiert diese in diesem Versuch mittels Cy3 (Rot) markierter Fluoreszenz. Um nachfolgend zu zeigen, welche Anteile der A $\beta$ -Ablagerungen von den pE-A $\beta$ -AK erkannt werden, wurden Doppelmarkierungen der verschiedenen pE-A $\beta$ -AK mit dem pan-A $\beta$ -AK 4G8 angefertigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die pE-A $\beta$ -Peptide im Zentrum der A $\beta$ -Ablagerungen befinden (siehe Abb. 21).

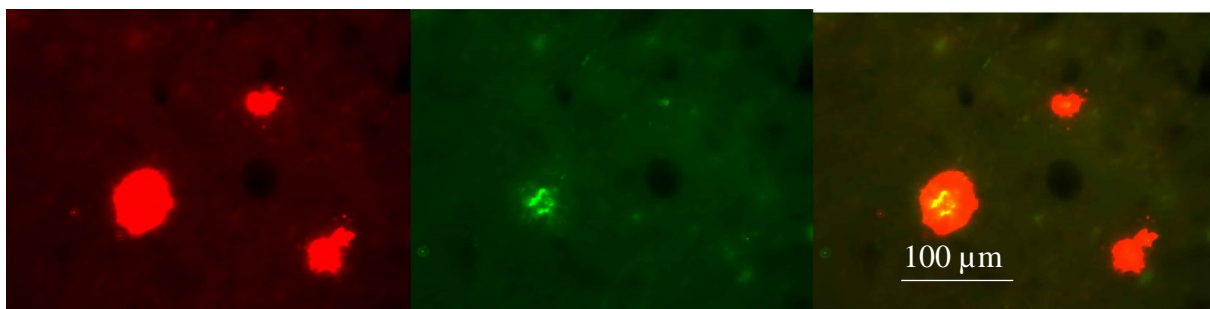


Abbildung 21: Darstellung der gesamten A $\beta$ -Peptide mittel AK 4G8 Cy3 markiert (links, Rot) und dem pE-A $\beta$ -Peptid mittels Antikörper F8 Cy2 markiert (Mitte, Grün). Rechts die Überlappung beider Antikörper.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, vier neue monoklonale AK hinsichtlich ihrer Eignung zur immunhistochemischen Darstellung von pE-A $\beta$  im Gehirn transgener Mäuse mit A $\beta$ -Pathologie zu untersuchen. Der seit längerem bekannte pE-A $\beta$ -AK von Synaptic Systems diente hierfür als Referenz zur Untersuchung der neu hergestellten monoklonalen AK K6, K24, K17 und F8. Mit verschiedenen Versuchsreihen konnte jeder einzelne AK in seiner Intensität und Spezifität bezüglich der toxischen pE-A $\beta$ -Ablagerungen im Hirngewebe APP-transgener Mäuse getestet werden.

Die derzeitige Fachliteratur ist der Meinung, dass das sehr toxische pE-A $\beta$  eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AD besitzt (Nussbaum 2012). Das Finden spezifischer AK, die das toxische pE-A $\beta$  binden und es somit unschädlich machen, könnte einen Ansatz zur Beeinflussung des Krankheitsverlaufs liefern. Jedoch ist nicht geklärt, ob die AD durch eine passive Immunisierung geheilt werden kann, da die Ursache dadurch nicht bekämpft, sondern nur eine toxische Substanz aus dem Kreislauf entfernt wird. Trotzdem wäre ein Aufhalten der Erkrankung in frühen Stadien ein großer Schritt im Kampf gegen die AD. Zahlreiche Symptome verschlechtern sich in späteren Stadien gravierend. Ein Leben nur mit den Frühsymptomen, auch in späteren Stadien der Erkrankung, würde vielen Menschen eine bessere Lebensqualität ermöglichen.

### 5.1 Methodische Betrachtung

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde die Methode der Immunhistochemie gewählt, da diese im Gegensatz zu anderen Visualisierungsmethoden zelluläre Strukturen besonders gut hervorhebt und somit eine gute Anfärbung der Plaques zu verzeichnen ist. Weiterhin ist durch die Möglichkeit der immunhistochemischer Fluoreszenz Doppelmarkierungen einzusetzen, ein guter direkter Vergleich zwischen den AK möglich.

Durch die Untersuchung eines kompletten Gehirns in verschiedenen Schnittebenen ist es möglich, einen guten Überblick über verschiedene Hirnregionen zu erhalten. Mit der Wahl von neun Schnittebenen pro Tier sind qualitativ hochwertige Ergebnisse über die kompletten Veränderungen eines Gehirns zu erzielen. Zudem kann über die AD-relevanten Areale eine Aussage getroffen werden. Durch die Wahl von Folgeschnitten liegen die analysierten Schnittebenen pro AK nur je 30  $\mu$ m voneinander entfernt. Dies ermöglicht zwar keine

Nutzung von identischen Schnitten, aber dennoch von nicht weit voneinander entfernten Schnittebenen. Damit sind die einzelnen Präparate besser miteinander vergleichbar.

Die Quantifizierung erfolgte mit zwei transgenen Tieren jeder Altersstufe. Die Fehlerwertberechnung der Mittelwerte (siehe jede Tabelle) zeigte, dass es keine erheblichen Differenzen zwischen den Tieren einer Altersstufe gibt und somit kann eine gute quantitative Aussage über die Plaquefärbung der einzelnen AK getroffen werden kann. Allerdings ist es wichtig, zu berücksichtigen, dass eine größere Fallzahl erforderlich wäre um einen allgemeingültigen Mittelwert zu erhalten.

Die Qualität ist durch das sorgfältige Durchführen der Färbung nach einem Färbeprotokoll gegeben, da für jeden Versuch dieselbe Vorgehensweise genutzt wurde und die gleichen Materialien wie Schneidewerkzeug, Puffer oder verwendete Normalseren genutzt werden. Auch in der Bestimmung der Plaquefläche wurde mittels Doppelblind-Auswertungen ein komplett wertungsfreies Ergebnis ermittelt. Durch den Einsatz des hochwertigen Digitalmikroskops Keyence BZ-9000 und der dazugehörigen Analyse-Software wurde eine bessere Bildqualität und Quantifizierung der Plaquefläche in % erzielt, als es mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop der Fall gewesen wäre. Da mit diesem Digitalmikroskop die Aufnahme des kompletten Schnittes möglich war und nicht, wie bei normalen Lichtmikroskopen, das Zusammenfügen von Einzelbildern zum Erlangen des Gesamtbildes nötig war.

## 5.2 Charakterisierung des Gehirngewebes

In der ersten Versuchsreihe wurde eine Auswahl an zur Verfügung stehenden Tieren (Tabelle 2) getroffen. Dies war wichtig, um später eine gute Bildqualität zu erhalten und unspezifische Färbungen auszuschließen und im Folgenden verringern zu können. Durch diese Testreihe wurde die Erkenntnis gewonnen, dass Gefäß- oder neuronaler Hintergrund nicht abhängig ist vom eingesetzten AK, sondern eher die Gewebequalität (Perfusion des Hirngewebes) jedes einzelnen Tieres diesen bestimmt. Das ist im Folgenden eine wichtige Erkenntnis um die Färbungen richtig zu analysieren und keine Fehlschlüsse über unspezifische Färbungen zu treffen. Weiterhin wird durch das Einsetzen von Tieren mit wenig Gefäßhintergrund die Analyse der Plaquefläche erleichtert. Die Aussage wird konkreter, da Gefäßanschnitte nicht versehentlich als kleine Plaques detektiert werden. Hierfür wurden ergänzend, mit Hilfe der Analyse-Software des Digitalmikroskopes Keyence, detektierte Plaques mit einer Fläche von unter 50  $\mu\text{m}^2$  bei jeder einzelnen Auswertung ausgeschlossen.

### 5.3 Darstellung von pE-A $\beta$ -Ablagerungen mit den fünf verschiedenen Antikörpern

Diese Testreihe zeigte sehr variable Ergebnisse für die verschiedenen verwendeten AK. Als Vergleich diente der bekannte AK Synaptic Systems. Es wurde deutlich, dass die fünf verschiedenen AK zwar die gleichen Strukturen erkennen, dies jedoch mit einer recht unterschiedlichen Intensität.

K17 zeigt eine dem Synaptic Systems nahe kommende Farbintensität. Ebenfalls zeigt F8 eine starke Visualisierung der A $\beta$ -Ablagerungen. Damit präferierten sich diese AK für weitere Versuchsreihen. K6 und K24 hingegen zeigten eine sehr schwache Darstellung der Plaques. Da bei dem AK K24 nur Schatten erkennbar waren und diese sich vom Hirngewebe farblich kaum abgrenzten, wurde dieser AK nicht für weitere Versuchsreihen genutzt. Die spätere Quantifizierung hätte zu hohen Falschergebnissen geführt, da die eindeutige Detektion der Plaques durch die geringe Anfärbung erschwert gewesen wäre. Da eine geringe Visualisierung jedoch auch auf eine hohe Spezifität hinweisen kann, wurde der AK K6 trotz geringer Intensität in den nachfolgenden Versuchsreihen mitgeführt.

Dieser Testversuch war sehr wichtig um eine erste Einschätzung und erste Vergleiche unter den AK zu erhalten. Aus den ursprünglich fünf AK wurden vier für die nächsten Versuchsreihen gewählt. Mit dieser Auswahl wurden AK in einem Intensitätsspektrum mitgeführt, die eine sehr geringe bis starke Visualisierung aufwiesen, die dem AK von Synaptic Systems sehr nahe kommt.

### 5.4 Verdünnungsreihen

Durch das einheitliche Schema bei der Durchführung der Verdünnungsreihen (siehe Tabelle 3) der AK K6, K17 und F8 sollte sichergestellt werden, dass jeder einzelne AK in der Konzentration eingesetzt wird, die nötig ist um die beste Färbung der A $\beta$ -Plaques zu erzielen. Somit sind spätere Vergleiche miteinander einfacher und besitzen eine höhere Aussagekraft.

Der AK K17 erlaubt eine sehr gute Visualisierung, da die Plaques deutlich abgrenzbar sind. Die Verdünnung von 1:250 wurde gewählt, da hier geringfügig mehr Plaques sichtbar wurden, als unter einer 1:500-fachen Verdünnung. Jedoch konnte das höhere Konzentrieren des primären AK keine besseren Ergebnisse erzielen. Vielmehr wurde deutlich, dass die Verdünnung von 1:100 zur erhöhten Hintergrundfärbung führte und die Schnitte insgesamt dunkler wurden. Dies lässt darauf schließen, dass der AK zwar A $\beta$ -Ablagerungen erkennt, jedoch in so einer hohen Konzentration vorhanden ist, dass er auch unspezifische Bindungen

eingeht. Um diese unspezifischen Bindungen zu vermeiden und eine höhere Sicherheit über die spezifische A $\beta$ -Peptid Visualisierung zu erlangen, wird der AK K17 in den nachfolgenden Untersuchungen in der Konzentration von 1:250 eingesetzt.

Der AK K6 zeigt eine schwache Visualisierung. Trotzdem wurde dieser AK in weiteren Versuchsreihen mitgeführt, da dieses Färbeverhalten ein Indiz für hohe Spezifität sein kann. Es ist möglich, dass dieser AK sehr spezifisch die zentralen pE-A $\beta$ -Ablagerungen markiert und die sich diesen zentralen Plaques angelagerten A $\beta$ -Peptiden nicht erkennt, denen die pE-Zyklisierung fehlt. Um trotzdem eine gute Auswertung im späteren Verlauf erzielen zu können, wurde die geringste Verdünnung von 1:100 gewählt, da hier das visuell beste Ergebnis erzielt werden konnte.

Das Färbemuster des AK F8 ist vergleichbar mit K17 und Synaptic Systems. Um die unspezifischen Bindungen zu vermeiden, wurde hier die Verdünnung von 1:250 gewählt, da, wie beim K17, bei höheren Konzentrationen der Hintergrund stärker markiert wurde.

Unstrittig blieb bei allen AK die Frage nach dem zu verwendendem sekundären AK. Bei jeder Verdünnungsreihe erzielte der IgG-Subtyp-spezifische Biotin-konjugierte Ziege-anti-Maus IgG AK in der Konzentration 1:200 die bessere Visualisierung. Die Subtyp-spezifischen Bio-Ziege-anti-Maus IgG sind den unselektiven Bio-Ziege-anti-Maus AK (der alle IgG-Subtypen erkennt) weit überlegen. Dies ist auch nicht ungewöhnlich, da dieser AK die dem primären AK spezifische IgG-Klasse erkennt und nicht alle IgG markiert.

Aus diesen Versuchsreihen wurden die Erkenntnisse über den Einsatz der Konzentrationen der jeweiligen AK gewonnen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch die Verwendung von sekundären AK der spezifischen IgG-Klasse eine bessere und spezifischere Visualisierung erlangt werden kann, als es mit sekundären AK welche alle IgG-Subtypen erkennen würden, wäre.

## 5.5 Screening der verschiedenen Antikörper

Mit Hilfe eines Screenings der jeweiligen AK konnte ein ganzheitlicher Überblick der Visualisierung der A $\beta$ -Plaques im Mausmodell dargestellt werden.

### 5.5.1 Antikörper Synaptic Systems

Einen Überblick des Färbemusters des AK ist durch die Abb. 9 zu gewinnen. Es wird sofort deutlich, dass der Synaptic Systems AK viele A $\beta$ -Plaques erkennt und sichtbar macht. Durch alle Schnittebenen des Großhirns, die in diesem Mausmodell untersucht wurden, sind pE-A $\beta$ -Ablagerungen vorhanden. Lediglich das Cerebellum (Schnittebene 7-9) zeigt keine pE-A $\beta$ -Plaques.

Vor allem im präfrontalen Cortex und im Hippocampus werden verstärkt größere Plaque-Ansammlungen durch den AK markiert. Im präfrontalen Cortex (Schnittebene 1) sind, je nach Altersstufe, 4,4 bis 5,5 % (siehe Abb. 10) des Schnittes mit Plaques besetzt. Dies ist die einzige Region in der sich in der jüngeren Altersstufe, eine ähnliche Plaquefläche visualisiert im Vergleich zur ältesten. In den weiteren Schnittebenen besitzt die 21 Monate alte Maus immer die höchste prozentuale Plaquefläche. Es ist festzustellen, dass die 16 monatige Altersstufe einen hohen Anteil an pE-A $\beta$ -Ablagerungen aufweist. Ein erklärender Ansatz findet sich hierfür in der Bildung der Plaques. Es ist anzunehmen, dass vor allem zu Beginn der Erkrankung (16 Monate) die Konzentration an pE-A $\beta$ -Ablagerungen im Gehirn größer ist, als mit 18 Monaten. Da davon ausgegangen wird, dass pE-A $\beta$  als Ausgangspunkt der Plaques hervorgeht und durch die verstärkte toxische Wirkung erst eine vermehrte A $\beta$ -Ablagerung entsteht, liegt es nahe, dass sich erhöhte Konzentrationen an pE-A $\beta$  im jungen Alter finden lassen. Andererseits wird pE-A $\beta$  in größeren Mengen schwerer abbaubar und reichert sich damit im Alter verstärkt an. Dies bestätigt sich in der Zusammenschau aller AK. Durch die initial hohen pE-A $\beta$ -Werte kommt es zu Aggregation und Ablagerung von weiteren A $\beta$ -Peptiden. Im mittleren Pathologie-Stadium (18 Monate) kommt es zur biologischen Antwort auf die Toxizität des pE-A $\beta$ . Es entstehen große Plaques durch vermehrte A $\beta$ -Ablagerungen entlang der pE-A $\beta$ -Peptide. Die Symptomatik der Erkrankung verschlechtert sich. Im Endstadium der Erkrankung steigt der Anteil an pE-A $\beta$  erneut an und es werden weitere Hirnregionen von A $\beta$ -Plaques befallen. Dies ist damit zu erklären, dass zum einen im hohen Alter die Plaquezahl und somit auch die Zentren des pE-A $\beta$  vermehrt nachweisbar, zum anderen differente Hirnareale betroffen sind. Durch den Befall weiterer Hirnareale wird mehr pE-A $\beta$  im Gehirn nachweisbar. Um diese neu entstandenen pE-A $\beta$ -Zentren können sich nun



weitere A $\beta$ -Ablagerungen gruppieren. Dies erklärt die starken motorischen Ausfälle und die Schwere der Erkrankung im höheren Alter.

Anhand des Screenings mit dem Synaptic Systems AK wurde gezeigt, dass dieser AK A $\beta$ -Plaques markiert und diese auch in den für die Pathogenese der AD typischen Hirnregionen detektiert. Des Weiteren ist anzunehmen, dass pE-A $\beta$ -Peptide den Ausgangspunkt der Plaques darstellen und vor allem zu Beginn der Erkrankung gehäuft auftreten, als dies im mittleren Stadium der Erkrankung der Fall ist. Es ist auch festzuhalten, dass im Kleinhirn keine pathologischen Prozesse in Form von pE-A $\beta$ -Ablagerungen nachzuweisen sind. Dies korreliert mit der klinischen Symptomatik der AD, die selten Kleinhirnstörungen aufweist.

### 5.5.2 Antikörper K17

Die vom AK K17 angefärbten Plaques sind in der Abb. 11 gut zu erkennen. Setzt man die Visualisierung in einen Vergleich zum Synaptic Systems AK, imponiert das Plaquesignal etwas schwächer.

Bei diesem AK wird deutlich, dass im präfrontalen Cortex (Schnittebene 1) aller Altersstufen die meisten Plaques vorzufinden sind. Dies lässt die Überlegung zu, dass dieser AK spezifischer die pE-A $\beta$ -Zentren erkennt, als der Synaptic Systems AK. pE-A $\beta$ -Peptide finden sich erst im präfrontalen Cortex und im späteren Verlauf der Erkrankung in tiefer gelegenen Hirnarealen, weshalb in tieferen Hirnarealen zwar ein Signal zu verzeichnen ist, jedoch deutlich abgeschwächt. Diese Hypothese wird durch die im Vergleich zum Synaptic Systems allgemein geringere Plaquefläche gestärkt.

Die Hirnregionen weisen einen chronologischen Anstieg der Plaquefläche innerhalb der Altersstufen auf. Als Beispiel soll hier die Schnittebene fünf, die den anterioren Hippocampusbereich enthält, dienen: 16 Monate 0,55%, 18 Monate 0,8% und 21 Monate 2,05% Plaquefläche. Der größere Anteil der Plaquefläche im Altersgang, ist ein der AD entsprechendes Bild. Diese Werte korrelieren mit der Verstärkung der Symptome im späten Verlauf der Erkrankung und erklären die steigende Pflegebedürftigkeit der Erkrankten. Je mehr Plaques nachweisbar sind, desto mehr Hirnfunktionen sind beeinflusst und die verbleibenden Neuronen verlieren die Fähigkeit, diese Ausfälle zu kompensieren.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass dieser AK nur pE-A $\beta$ -Ablagerungen zeigt, die sich in den Zentren der Plaques befinden und von denen die Ablagerungen ausgehen. Somit wird von

jedem Plaque nur das Zentrum gezeigt und nicht die kompletten Ablagerungen (siehe Abb. 21).

Dieses Screening lässt die Erkenntnis zu, dass dieser AK sehr gut immunhistochemisch die pE-A $\beta$ -Zentren der Plaques visualisiert, jedoch dieselben Strukturen detektiert, wie der Synaptic Systems AK.

### 5.5.3 Antikörper K6

In Abb. 13 wird deutlich, dass K6 im Vergleich zu den anderen AK sehr wenige Plaques färbt und die Schnitte im Allgemeinen ein sehr viel schwächeres Färbesignal aufweisen. Obwohl das initiale Screening von einem 21 monatigem Tier stammt, sind die pE-A $\beta$ -Plaques schwer zu erkennen.

Vergleicht man den K6 AK mit den anderen AK wird deutlich, dass die nachgewiesene Plaquefläche sehr viel kleiner ist. Als Beispiel dient hier beim 21 Monate alten Tier die Schnittebene sechs, die den posterioren Hippocampusbereich enthält: Synaptic Systems 5,6% und K6 0,2%. Jedoch kann man in Abb. 14 trotzdem einen chronologischen Anstieg der Plaquefläche mit steigendem Alter erkennen. Die 21 monatigen Tiere zeigen in jeder Hirnregion bis auf den präfrontalen Cortex die größte Plaquefläche. Dort zeigen die Mittelwerte der 16 monatigen Tiere die meisten pE-A $\beta$ -Peptide.

Der AK ist zur Visualisierung der pE-A $\beta$ -Plaques eher weniger geeignet, da er zwar dieselben Strukturen erkennt, das Signal jedoch schwach ist. Dieser AK erscheint für die immunhistochemische Darstellungen an Hirngewebe dieser transgenen Mäuse ungeeignet. Inwiefern anderes Gewebe prädisponierender ist, kann durch diese Versuchsreihe nicht bewertet werden. An dieser Stelle soll aber die Spezifität gegenüber pE-A $\beta$  nicht in Frage gestellt werden, da die Fluoreszenz-Doppelmarkierungen eine KO-Lokalisation von K6 mit K17 und F8 zeigten (siehe 4.5 Doppelimmunfluoreszenz). Es ist eher davon auszugehen, dass die Festigkeit der Bindung für diese Färbervariante nicht ausreicht und eine geringe Affinität vorliegt.

#### 5.5.4 Antikörper F8

In der Abb. 15 wird erkennbar, dass dieser AK die pE-A $\beta$ -Plaques genauso deutlich zeigt wie der Synaptic Systems oder K17 AK. In jeder Schnittebene sind Plaques sichtbar, ausgenommen im Cerebellum. Die prozentuale Plaquefläche beträgt weniger, als die von dem K17 AK und Synaptic Systems.

Der AK K6 besitzt in der quantitativen Auswertung eine Ähnlichkeit zu K17, denn die Plaquefläche ist vergleichbar und steigt im Altersgang. Dies ist in jeder Hirnregion deutlich. Jedoch steigt die Plaquefläche zwischen 18 und 21 Monaten meist bis auf das Doppelte an. Im Gegensatz dazu ist der Anstieg der Plaquefläche zwischen 16 und 18 monatigen Tieren gering.

Die chronologische Steigerung der Plaquefläche mit höherem Alter spiegelt gut die mit dem Alter schwerwiegendere Symptomatik der AD in diesem Mausmodell wider. Die nur geringe Vermehrung der pE-A $\beta$ -Plaques bei den 18 monatigen Tieren bestätigt die Annahme, dass am Anfang viel pE-A $\beta$ -Peptide vorhanden sind, sich danach vor allem nicht zyklisierte A $\beta$ -Peptide an das toxische pE anlagern und erst beim Übergreifen der Symptomatik auf motorische Ausfälle die Zahl der pE-A $\beta$ -Ablagerungen wieder steigt.

Es kann die Erkenntnis gewonnen werden, dass F8 eine sehr gute Visualisierung der Plaques liefert. Neben dem Synaptic Systems AK und K17 hat dieser AK eine gute Plaquefärbung im Mäusegewebe und zeigt auch zwischen den verschiedenen Tieren einer Altersstufe sehr niedrige Fehlerwertmessungen.

#### 5.5.5 Direkter Vergleich der verschiedenen Antikörper

Betrachtet man die vier AK untereinander (Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19) wird erkennbar, dass Synaptic Systems von der prozentualen Fläche die meisten Plaques in jeder Altersstufe anfärbt. K17 und F8 zeigen eine geringere und untereinander ähnliche Intensität und K6 AK fällt durch die geringe Plaque-Darstellung aus der Reihe.

Vergleicht man 16 und 18 monatige Tiere ist die Differenz zwischen dem Synaptic Systems und den anderen AK ziemlich groß. Erst bei den 21 monatigen Tieren gleichen sich die Werte an. Dies lässt die Vermutung zu, dass K17 und F8 in ihrer Färbintensität gegenüber pE-A $\beta$ -Ablagerungen dem Synaptic Systems überlegen sind. Transgene Mäuse zeigen zu Beginn der Pathologie leichte kognitive Ausfälle, was nahe legt, dass sich in jüngeren Altersstufen quantitativ weniger pE-A $\beta$ -Plaques im Gehirngewebe befinden. Diese AK zeigen spezifisch

die im Zentrum von den Plaques angereicherten zyklisierten A $\beta$ -Peptid Veränderungen und keine umher gelagerten nicht zyklisierten A $\beta$ -Peptide. Es ist anzunehmen, dass der Synaptic Systems AK zwar pE-A $\beta$ -Peptide erkennt, jedoch auch einige A $\beta$ -Peptide, die nicht zyklisiert vorliegen. Somit vergrößert sich die gesamte Plaquefläche und das visualisierte Signal steigt. K17 und F8 hingegen zeigen nur die Zentren der Plaques, da sich dort das toxische pE-A $\beta$  befindet. Durch ihre höhere Eignung zur Visualisierung werden keine weiteren nicht zyklisierten A $\beta$ -Peptide angefärbt. Dies führt zwar zu einer geringeren Plaquefläche, aber trotzdem zu einem starken Visualisieren der Plaques und einem guten Abgrenzen dieser vom Hirngewebe.

Somit ist festzuhalten, dass die toxischen pE-A $\beta$ -Ablagerungen schon frühzeitig im untersuchten Mausmodell vorzufinden sind und den Verlauf der AD- Symptomatik gut widerspiegeln. Da pE-A $\beta$  sehr toxisch auf das umliegende Gewebe wirkt, reicht ein geringes Vorkommen aus, damit sich leichte kognitive Ausfälle klinisch manifestieren (siehe 1.1 Morbus Alzheimer). In späteren Altersstufen nimmt die pE-A $\beta$ -Konzentration stark zu. Dies ist begleitet von immer schwerwiegenderen Symptomen, die nun auch motorischen Ursprungs sind. Das gesunde Gewebe ist nicht mehr in der Lage die pathologischen Veränderungen zu kompensieren - die neuronale Aktivität nimmt ab.

Möglicherweise werden durch komplexe, noch unerforschte Vorgänge, pE-A $\beta$ -Ablagerungen in Frühstadien aus dem Gehirn heraustransportiert oder abgebaut. Ab einer gewissen Konzentration dieser giftigen Substanz versagt dieser Mechanismus und es kommt zum enormen Anstieg der pE-A $\beta$ - Plaques im Gehirn. Dadurch werden vermehrt A $\beta$ -Peptide den toxischen Zentren angelagert und die Plaques, somit auch die neuronalen Ausfälle, nehmen zu.

Während der Klon K24 für die Plaquedarstellung ungeeignet ist, wurden für die Klone K17 und F8 vergleichbare, wenn auch geringere Plaqueflächen nachgewiesen als für den kommerziell verfügbaren Antikörper von Synaptic Systems. Der pE-A $\beta$ -Antikörper K6 markierte die geringste Plaquefläche. Dies könnte auf eine höhere Spezifität oder auf eine geringere Sensitivität von K17, F8 und K6 gegenüber dem Synaptic Systems Antikörper zurückzuführen sein.

## 5.6 Doppelimmunfluoreszenz der getesteten Antikörper

Durch Doppelmarkierungen mit Hilfe von fluoreszierenden IgG-Subtypspezifischen AK, wurde ein direkter Vergleich der Plauefärbung zwischen zwei AK möglich.

Diese Versuchsreihe erbrachte die Erkenntnis, dass K17 und F8 untereinander die pE-A $\beta$ -Plaques mit derselben Intensität erkennen und visualisieren. Synaptic Systems stellt die Plaques in einer höheren Intensität dar und durch den AK K6 werden an Plaqueflächen nur leichte Schatten sichtbar. Jedoch werden dieselben Plaques von den verschiedenen AK detektiert. Somit ist bestätigt, dass alle AK die gleichen Peptide erkennen - in diesem Fall pE-A $\beta$ . Dadurch ist auch die Eignung zur Anfärbung des AK K6 bewiesen, obwohl die Ergebnisse bei beiden Färbungen schwach ausfielen. Es ist anzunehmen, dass dieser AK ungeeignet ist für Visualisierungen speziell am Mausgewebe. Inwiefern dieser AK an anderem Gewebe pE-A $\beta$ -Peptide visualisiert, konnte mit dieser Versuchsreihe nicht geklärt werden. Jedoch ist festzuhalten, dass die Visualisierung von pE-A $\beta$  gewährleistet ist.

Durch diese Versuchsreihe ist weiterhin festzustellen, dass der Synaptic Systems AK die Plaqueflächen mit einem stärkeren Signal darstellt, als die anderen getesteten AK. K17 und Synaptic Systems wurden zur weiteren Überprüfung in einer Doppelmarkierung getestet. Das heißt, die Cy Markierungen wurden unter diesen AK getauscht um Fehler der sekundären fluoreszierenden AK auszuschließen. Dabei erzielte Synaptic Systems immer ein stärkeres Signal als K17. Somit ist festzuhalten, dass der Synaptic Systems AK ein höheres Färbepotential in diesem Mausmodell besitzt, als die anderen AK. Dies wurde in den DAB-Färbungen deutlich und konnte mithilfe der Fluoreszenz bestätigt werden. Der Synaptic Systems AK ist für die Visualisierung von Plaques am Mausgewebe der nützlichste unter den in dieser Studie untersuchten AK.

Durch das Markieren derselben Strukturen wurde bewiesen, dass der AK von Synaptic Systems und die neuen AK pE-A $\beta$  auf die gleiche Weise detektieren. Jedoch besitzen alle verschiedenen AK eine andere Anfärbstärke bezüglich des pE-A $\beta$  und somit auch eine individuelle Darstellung der Plaques.

Mit Hilfe der Doppelmarkierung der pE-A $\beta$ -AK mit dem AK 4G8 konnte gezeigt werden, dass sich die toxischen pE-A $\beta$ -Peptide im Zentrum der gesamten A $\beta$ -Ablagerungen befinden. Anhand der Überlappung in Abb. 21 wird die zentrale Lokalisation des pE-A $\beta$ -Peptides verdeutlicht.

## 5.7 Ausblick der Arbeit

In dieser Arbeit konnten vier neue monoklonale AK bezüglich ihrer Eignung zur immunhistochemischen Darstellung von pE-A $\beta$  im Hirn transgener Mäuse mit A $\beta$ -Pathologie charakterisiert werden. Mit Hilfe dieser AK wird ein Weg geerdet, der es eventuell bald ermöglicht einen Impfstoff zu entwickeln. Durch einen hoch sensitiven Impfstoff können Nebenwirkungen reduziert und der klinische Langzeitgebrauch ermöglicht werden. Eine Immunisierung im Frühstadium der AD könnte die Schwere der Erkrankung erheblich mindern. Es wird noch Jahre dauern, bis man die AD in ihrer detaillierten Entstehung versteht und womöglich wird man in der Zukunft schon das Ausbrechen dieser Erkrankung verhindern können. Doch bis man an diesen Punkt gelangt, würde eine Immunisierung gegen das toxische pE-A $\beta$ , dem der Ursprung der Krankheit zugerechnet wird, vielen Patienten eine Pflegebedürftigkeit im Endstadium ersparen und den Verlauf der Erkrankung mildern.

Für Färbungen besonders geeignet sind die AK Synaptic Systems und K17, da diese beiden AK eine sehr gute Visualisierung der pE-A $\beta$ -Plaques ermöglichen. Jedoch ist eine hohe Spezifität für spätere Immunisierungen von hoher Bedeutung. Für die Immunisierung besonders geeignet wären die AK K6 und F8, da diese AK spezifischer erkennen. Jedoch ist diese Spezifität bei der Visualisierung der pE-A $\beta$ -Peptid-Ablagerungen eher kontraproduktiv und führt zum schwächeren Signal.

Zudem sind sensitive AK für die klinische Diagnosestellung von großer Bedeutung. AK gegen pE-A $\beta$ -Peptide könnten als Fundament für die Bestimmung von spezifischen Laborparametern dienen. Dies würde die klinische Diagnostik erleichtern. Eine frühzeitige Erkennung der AD mithilfe von Laborparametern wäre nicht nur für Ärzte, die eine sichere Diagnose stellen könnten und nicht nach anderen möglichen Ursachen für die anfängliche leichte Vergesslichkeit der Patienten suchen müssten von Vorteil. Auch würde den Patienten frühzeitig eine Möglichkeit geboten werden, durch gesunde Lebensführung und protektive Maßnahmen der späteren Symptomatik entgegenzuwirken. Tägliches Gehirnjogging könnte bei frühzeitiger Diagnose die neuronalen Verbindungen steigern. Dies würde sich protektiv auf den Verlauf der AD auswirken.

## 6 Zusammenfassung der Arbeit

Die biologischen Grundlagen und sozioökonomischen Auswirkungen der AD sind ein aktuelles Thema unserer immer älter werdenden Gesellschaft. Doch bis heute sind nicht alle pathophysiologischen Vorgänge erforscht, um diese Erkrankung in ihrer Ursache zu verstehen und damit Ansätze für eine adäquate Therapie zu ermöglichen. Eine weit verbreitete Theorie zur Krankheitsentstehung ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die A $\beta$ -Peptiden eine zentrale Rolle bei der Alzheimer-Pathogenese zuspricht. Diese A $\beta$ -Peptide entstehen durch proteolytische Prozessierung des APP und sind auch im Gehirn von nicht-dementen älteren Menschen nachweisbar. Neue Forschungsergebnisse legen nahe, dass bestimmte posttranslationale Modifikationen des A $\beta$ -Peptids zu verringertem Abbau, erhöhter Aggregation und gesteigerter Neurotoxizität beitragen. Eine solche besonders pathogene A $\beta$ -Variante ist pE-A $\beta$ . Es entsteht durch N-terminale Verkürzung von A $\beta$  um zwei Aminosäuren und folgende Zyklisierung des N-terminalen Glutamats zu pE. Eine Möglichkeit die Bildung, den Transport und die Ablagerung von pE-A $\beta$  im Gehirn verstorbener Alzheimer-Patienten und im Gehirn von Versuchstieren mit Amyloid-Pathologie zu untersuchen, ist die Verwendung spezifischer AK.

Ziel dieser Arbeit war es, vier neue monoklonale AK hinsichtlich ihrer Eignung zur immunhistochemischen Darstellung von pE-A $\beta$  im Gehirn transgener Mäuse mit A $\beta$ -Pathologie zu untersuchen.

Für diese Untersuchungen wurden transgene Mäuse des Stammes Tg2576 verwendet. Diese exprimieren humanes APP der neuronalen Isoform mit 695 Aminosäuren mit der sogenannten schwedischen Doppelmutation KM670/671NL. Diese Mutation sorgt dafür, dass APP ein besseres Substrat für die amyloidogene Prozessierung ist und verstärkt A $\beta$  gebildet wird. Tg2576-Mäuse entwickeln ab einem Alter von 11 bis 13 Monaten Alzheimer-typische Amyloidablagerungen im Neokortex und im Hippocampus. In der vorgelegten Arbeit wurden Mäuse im Alter von 16, 18 und 21 Monaten untersucht, um zu prüfen ob mit den neuen pE-A $\beta$ -Antikörpern die in anderen Arbeiten beschriebene Zunahme der A $\beta$ -Pathologie im Alterungsprozess dargestellt werden kann. Als Kontrollen wurden gleichaltrige Wurfgeschwister, die das Transgen nicht exprimieren, verwendet. Pro Altersstufe wurden zwei transgene Mäuse und ein Wildtyp-Tier untersucht.

Die vier neuen zu charakterisierenden monoklonalen pE-A $\beta$  AK wurden von der Firma Probiobrug AG, Halle/Saale zur Verfügung gestellt. Sie wurden durch Immunisierung von C57Bl6-Mäusen mit einem Hexapeptid aus dem N-Terminus von pE-A $\beta$  (Sequenz pEFRHDS) generiert. Diese vier monoklonalen Antikörper besaßen verschiedene IgG-Subtypen: Klon K6 (IgG1), Klon K17 (IgG2b), Klon K24 (IgG1), Klon F8 (IgG3). Vergleichend wurde ein pE-A $\beta$ -Antikörper der Firma Synaptic Systems (Klon 2-48) vom Subtyp IgG1 verwendet.

Auswahl der untersuchten Gehirne – „Gefäßhintergrund“. Durch ungleichmäßige Perfusion und Fixierung der Gehirne kann es zu einer unerwünschten Färbung von Blutgefäßen kommen, wodurch die Quantifizierung von Plaques erschwert wird. Um dies zu vermeiden wurden die Gehirne von 13 Mäusen hinsichtlich dieses Kriteriums mittels Immunhistochemie mit dem pE-A $\beta$ -Antikörper von Synaptic Systems untersucht und anschließend ausschließlich Tiere ohne oder mit sehr geringem Gefäßhintergrund verwendet.

Eignung der neuen monoklonalen primären pE-A $\beta$ -Antikörper. Es wurde eine Versuchsreihe angefertigt, um die immunhistochemischen Färbungen der vier neuen monoklonalen pE-A $\beta$ -Antikörper an Mäusegewebe zu testen und diese mit dem etablierten Synaptic Systems Antikörper zu vergleichen. Die Testreihe zeigte erwartungsgemäß, dass der Synaptic Systems pE-A $\beta$ -Antikörper, aber auch die neuen Antikörper K6, K17 und F8 eine gute, jedoch auch unterschiedlich intensive Plauefärbung erbrachten. Der Antikörper K24 wurde aus den weiteren Versuchsreihen ausgeschlossen, da keine Plauefärbung nachweisbar war.

Verdünnungsreihen der primären pE-A $\beta$ -Antikörper. Die verwendete Konzentration eines AK kann die Intensität der spezifischen Färbung, aber auch die Hintergrundfärbung stark beeinflussen. Deshalb galt es festzulegen, in welchen Verdünnungen die neuen primären pE-A $\beta$ -Antikörper zur Quantifizierung der Plauefläche im Gehirn transgener Tg2576-Mäuse eingesetzt werden sollten. Für jeden einzelnen AK wurde eine Verdünnungsreihe (1:100; 1:250; 1:500) angefertigt und die Verdünnung bestimmt, welche die beste immunhistochemische Visualisierung der A $\beta$ -Ablagerungen ermöglicht. Dies war für den Klon K6 1:100, für Klon K17 1:250 und für Klon F8 1:250.

Verwendung geeigneter Sekundär-Antikörper. Kommerziell verfügbare Sekundär-Antikörper gegen Maus-IgGs erkennen entweder alle IgG-Subtypen, oder sind gegen einzelne IgG-Subtypen gerichtet. Um geeignete Sekundär-Antikörper zum Nachweis der pE-A $\beta$ -Antikörper für die Plaue-Darstellung zu identifizieren, wurden verschiedene Verdünnungen (1:200 und



1:400) von nicht-Subtyp-spezifischen und von Subtyp-spezifischen biotinylierten Ziege anti-Maus IgGs getestet. Dabei zeigte sich, dass in jedem Fall die biotinylierten subtypspezifischen sekundären Ziege anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 die geringste Hintergrundfärbung und das deutlichste Signal erbrachten. Deshalb wurden nur diese für die folgenden Versuchsreihen eingesetzt.

Quantifizierung der Plaque-Beladung im Gehirn transgener Tg2576-Mäuse. Um die Plaque-Beladung in definierten Hirnstrukturen APP-transgener Tg2576-Mäuse zu quantifizieren, wurden für jeden der vier untersuchten pE-A $\beta$ -Antikörper (Synaptic Systems, K6, K17 und F8) in drei Altersstufen (16, 18 und 21 Monate) in neun verschiedenen koronalen Schnittebenen immunhistologische Färbungen durchgeführt. Die Schnittebenen befanden sich auf Ebenen, die folgende Strukturen enthalten: 1 Präfrontaler Kortex, 2 Basales Vorderhirn, 3 anteriore Kommissur, 4 Nucleus basalis, 5 Hippocampus anterior, 6 Hippocampus posterior, 7 Locus coeruleus anterior, 8 Locus coeruleus posterior, 9 kaudaler Hirnstamm. Dies ermöglichte es, in verschiedenen Hirnregionen die Ablagerung von pE-A $\beta$  während des Alterungsprozesses zu untersuchen. Es wurden für jede Hirnregion die aufeinanderfolgenden Schnitte für die vier primären Antikörper ausgewählt, sodass ein Maximalabstand von 120  $\mu$ m zwischen den Färbungen der pE-A $\beta$ -Antikörper besteht, da jeder Schnitt eine Dicke von 30  $\mu$ m aufwies.

Da je Altersstufe zwei Tiere analysiert wurden, ergeben sich pro Antikörper und Altersstufe 18 gefärbte und quantifizierte Schnitte, demzufolge resultiert pro untersuchtem AK eine Gesamtzahl von 54 Schnitten. Die Gesamtzahl der ausgewerteten Schnitte dieser Arbeit beträgt 224.

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms BZ-II-Analyzer, einer Analysesoftware des Digitalmikroskops Keyence. Durch eine Aufnahme des kompletten Hirnschnitts und Markierung der Plaquefläche konnte deren prozentualer Anteil an der Hirnschnittfläche bestimmt werden.

Betrachtet man die vier Antikörper untereinander, wird erkennbar, dass der pE-A $\beta$ -Antikörper von Synaptic Systems in jeder Altersstufe die größte Plaquefläche darstellt. Die pE-A $\beta$ -Antikörper K17 und F8 zeigen eine geringere und untereinander ähnliche Plaquefläche. Der K6 Antikörper weist die geringste Plaquefläche nach.

Im Altersgang ist für alle untersuchten pE-A $\beta$ -Antikörper eine Zunahme der markierten Plaquefläche nachweisbar.

Die untersuchten Gehirnschnittebenen sind unterschiedlich stark von pE-A $\beta$ -Ablagerungen betroffen. Die am weitesten rostral gelegene Schnittebene mit präfrontalem Kortex weist besonders viele pE-A $\beta$ -Ablagerungen auf, während die darauf folgende Schnittebene deutlich weniger pE-A $\beta$ -Ablagerungen zeigt. Danach gibt es Richtung kaudal wieder eine Zunahme der pE-A $\beta$ -Ablagerungen. In den Schnittebenen 7, 8 und 9 wurden keine pE-A $\beta$ -Ablagerungen nachgewiesen.

Doppelmarkierungen von pE-A $\beta$ -Antikörpern verschiedener IgG-Subtypen und mit dem pan-A $\beta$ -Antikörper 4G8. Um nachzuweisen, ob alle untersuchten pE-A $\beta$ -Antikörper dieselben Strukturen darstellen, wurde eine Versuchsreihe mit Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen angefertigt. Obwohl die primären monoklonalen pE-A $\beta$ -Antikörper alle in der Maus generiert wurden, erlaubten die verschiedenen IgG-Subtypen eine Doppelmarkierung mit Subtypenspezifischen Sekundärantikörpern. Dabei zeigte sich, dass alle pE-A $\beta$ -Antikörper dieselben Anteile von A $\beta$ -Ablagerungen erkennen. Um nachfolgend zu zeigen, welche Anteile der A $\beta$ -Ablagerungen von den pE-A $\beta$ -Antikörpern erkannt werden, wurden Doppelmarkierungen der verschiedenen pE-A $\beta$ -Antikörper mit dem pan-A $\beta$ -Antikörper 4G8 angefertigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die pE-A $\beta$ -Peptide im Zentrum der A $\beta$ -Ablagerungen befinden.

In dieser Arbeit konnten vier neue monoklonale AK bezüglich ihrer Eignung zur immunhistochemischen Darstellung von pE-A $\beta$  im Hirn transgener Mäuse mit A $\beta$ -Pathologie charakterisiert werden. Während der Klon K24 für die Plaquedarstellung ungeeignet ist, wurden für die Klone K17 und F8 vergleichbare, wenn auch geringere Plaqueflächen nachgewiesen als für den kommerziell verfügbaren Antikörper von Synaptic Systems. Der pE-A $\beta$ -Antikörper K6 markierte die geringste Plaquefläche. Dies könnte auf eine höhere Spezifität oder auf eine geringere Sensitivität von K17, F8 und K6 gegenüber dem Synaptic Systems AK zurückzuführen sein.

Mit Hilfe monoklonaler AK gegen pE-A $\beta$  könnte es möglich sein, einen Impfstoff zu entwickeln, der gegen eine besonders toxische A $\beta$ -Peptid-Variante gerichtet ist. Eine Immunisierung im Frühstadium der AD würde zwar nicht die Erkrankung in ihrem Ursprung heilen, könnte aber deren Verlauf verlangsamen.

Zudem ist es denkbar, spezifische Antikörper gegen besonders neurotoxische pE-A $\beta$ -Varianten für die klinische Diagnosestellung zu etablieren.

- Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A., & Tennstedt, A. (1983). Loss of Neurons in the Nucleus Basalis of Meynert in Alzheimer's Disease, Paralysis Agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathologica*, 61, S. 101-108.
- B. Vellas, R. B., & Team. (2009). Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. *Current Alzheimer Research*, 6, S. 144-51.
- Ballatore, C., Lee, V., & Trojanowski, J. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(9), S. 663-672.
- Berlit, P. D. (2007). *Basiswissen Neurologie* (Bd. V). Essen: Springer Medizin Verlag.
- Bertram, L., Lill, C., & Tanzi, R. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron.*, 68(2), S. 270-281.
- Beyreuther, K., Einhäupl, K. M., Förstl, H., & Kurz, A. (2002). *Demenzen - Grundlagen und Klinik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4).
- Braak, H., Feldengut, S., & Tredici, K. D. (2013). Pathogenese und Prävention des M. Alzheimer. *Nervenarzt*, 84(4), S. 477-482.
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., & Haass, H. S. (2002). Insulin-degrading Enzyme Rapidly Removes the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD). *The Journal of biological Chemistry*, 277(16).
- Fodero-Tavoletti, M. T., Villemagne, V. L., Rowe, C. C., Masters, C. L., Barnham, K. J., & Cappai, R. (2011). Amyloid- $\beta$ : The seeds of darkness. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(9), S. 1247-1257.
- Frost, J. L., Le, K. X., Cynis, H., Ekpo, E., Kleinschmidt, M., Palmour, R. M., . . . Lemere, C. (2013). Pyroglutamate-3 Amyloid- $\beta$  Deposition in the Brains of Humans, Non-Human Primates, Canines, and Alzheimer Disease-Like Transgenic Mouse Models. *The American Journal of Pathology*, 183(2), S. 369-81.
- Grimm, M. O., Mett, J., Stahlmann, C. P., Grösgen, S., Haupenthal, V. J., Blümel, T., . . . Hartmann, T. (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, S. 77.
- Grimm, M. O., Mett, J., Stahlmann, C. P., Haupenthal, V. J., Zimmer, V. C., & Hartmann, T. (2013). Neprilysin and A $\beta$  clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. *frontiers in Aging Neuroscience*, 5, S. 98.

- Hallauer, J. F., & Kurz, A. (2002). *Weißbuch Demenz - Versorgungssituation relevanter Demenzerkrankungen in Deutschland*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Hardy, J., & Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), S. 184-185.
- He, W., & Barrow, C. (1999). The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry*, 38(33), S. 10871-10877.
- Krämer, D. m., & Förstl, P. D. (2008). *Alzheimer und andere Demenzformen*. TRIAS.
- Lange-Asschenfeldt, C. (2013). Vaskuläre Faktoren in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit. *Nervenarzt*, 84(6), S. 732-737.
- Lee, J., Gillman, A. L., Jang, H., Ramachandran, S., Kagan, B. L., Nussinov, R., & Arce, F. T. (2014). Role of the Fast Kinetics of Pyroglutamate-Modified Amyloid- $\beta$  Oligomers in Membrane Binding and Membrane Permeability. *Biochemistry*, 53(28), S. 4704-4714.
- Masters, C., Cappai, R., Barnham, K., & Villemagne, V. (2006). Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), S. 1700-1725.
- Mawuenyega, K., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J., . . . Bateman, R. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330(6012).
- McLean, Cherny, Fraser, Fuller, Smith, Beyreuther, . . . Masters. (December 1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 46(6).
- Medeiros, R., & LaFerla, F. (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology*, 239, S. 133-138.
- Meißner, J., Bouter, Y., & Bayer, T. (2015). Neuron Loss and Behavioral Deficits in the TBA42 Mouse Model Expressing N-Truncated Pyroglutamate Amyloid- $\beta$ 3-42. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(2), S. 471-482.
- Morawski, M., Schilling, S., Kreuzberger, M., Waniek, A., Jäger, C., Koch, B., . . . Roßner, S. (2014). Glutaminy Cyclase in Human Cortex: Correlation with (pGlu)-Amyloid- $\beta$  Load and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 39(2), S. 385-400.
- Morris, J., & Price, J. (2001). Pathologic correlates of nondemented aging, mild cognitive impairment, and early-stage Alzheimer's disease. *Journal of molecular Neuroscience*, 17(2), S. 101-118.
- Nussbaum, J. M., Schilling, S., Cynis, H., Silva, A., Swanson, E., Wangsanut, T., . . . Bloom, G. (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- $\beta$ . *Nature*, 485(7400), S. 651-655.

- Polidori, M., Stahl, W., Spirt, S. D., & Pientka, L. (2012). Einfluss vaskulärer Komorbiditäten auf die antioxidative Abwehr bei Alzheimer-Demenz. *Deutsches Medizinische Wochenschriften*, 137(7), S. 305-8.
- Roßner, S., Sastre, M., Bourne, K., & Lichtenthaler, S. F. (2006). Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression - Implications for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 79(2), S. 95-111.
- Russo, C., Violani, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., . . . Schettini, G. (2002). Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *Journal of Neurochemistry*, 82(6), S. 1480-1489.
- Saido, T. (1998). Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiology of Aging*, 19(1 Suppl), S. 69-75.
- Savonenko, A., Melnikova, T., Hiatt, A., Li, T., Worley, P., Troncoso, J., . . . Price, D. (2012). Alzheimer's therapeutics: translation of preclinical science to clinical drug development. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), S. 261-77.
- Schilling, S., Appl, T., Hoffmann, T., Cynis, H., Schulz, K., Jagla, W., . . . Demuth, H. (2008). Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Abeta formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ. *Journal of Neurochemistry*, 106(3), S. 1225-1236.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Letters*, 563(1-3), S. 191-196.
- Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Böhm, G., & Demuth, H.-U. (2006). On the Seeding and Oligomerization of pGlu-Amyloid Peptides (in Vitro). *Biochemistry*, 45(41), S. 12393-9.
- Snowdon, D., & StudyNun. (2003). Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study. *Annals of internal medicine*, 139(5 Pt2), S. 450-4.
- Upadhaya, A. R., Kosterin, I., Kumar, S., Christine A. F. von Arnim, H. Y., Marcus Fändrich, J. W., & Thal, D. R. (2014). Biochemical stages of amyloid- $\beta$  peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *BRAIN - A Journal of neurology*, 137(Pt 3), S. 887-903.
- Wallesch, C.-W., & Förstl, P. D. (2005). *Demenzen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Wilson, M., & McNaughton, B. (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, 261(5155), S. 1055-1058.
- Wirths, O., Erck, C., Martens, H., Harmeier, A., Geumann, C., Jawhar, S., . . . Bayer, T. A. (2010). Identification of low molecular weight pyroglutamate Abeta Oligomers in Alzheimer Disease: A novel tool for therapy and diagnosis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), S. 41517-24.

## 8 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

16.03.2017

Datum

.....

Unterschrift

## 9 Lebenslauf

### ANGABEN ZUR PERSON

Name	Katarina Dušek
Geburtsdatum	30.04.1992
Geburtsort	Nitra
Familienstand	Ledig

### ARBEITSERFAHRUNG

Juli 2013 – August 2013	Fakultná nemocnica Nitra, Slowakei Station: Gynäkologie und Onkologie Famulatur
September 2013 – Oktober 2013	HELIOS Klinikum Erfurt  Station: Orthopädie und Unfallchirurgie Famulatur
Februar 2015 – März 2015	Mandeville Regional Hospital, Jamaika Allgemeine Chirurgie Famulatur

### SCHULBILDUNG

August 1998 – Juni 2002	Staatliche Grundschule „Am Schwemmbach“, Erfurt Grundschulabschluss
Juni 2008 – August 2008	Colegio Alemán Alexander von Humboldt, Sucre ( Bolivien) Schüleraustausch
August 2002 – Juni 2010	Kooperative Gesamtschule Erfurt, Erfurt Allgemeine Hochschulreife
6.September 2012	Universität Leipzig, Leipzig Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
15.Oktober 2015	Universität Leipzig, Leipzig Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. rer. nat. habil. Steffen Roßner für die fachlich und zwischenmenschlich sehr gute Betreuung meiner Dissertation. Ich danke ihm, für die schnelle Beantwortung offener Fragen, für die lehrreichen Gespräche und für die Unterstützung, ohne die die Fertigstellung meiner Dissertation undenkbar gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. rer. nat. Maike Hartlage-Rübsamen für die gute Einführung in die Methoden der Immunhistochemie und Mikroskopie sowie für die Ratschläge und den fachmännischen Blick auf die angefertigten Präparate danken. Weiterhin möchte ich Frau Dr. rer. nat. Corinna Höfling und Herrn Dr. rer. nat. Alexander Waniek dafür danken, dass sie mir bei fachlichen Fragen zur Seite standen.

Der Firma Probiodrug AG aus Halle an der Saale danke ich für die Bereitstellung der neuen Antikörper, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter des Paul-Flechsig-Instituts für Hirnforschung unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Arendt für das angenehme Arbeitsklima und die schnelle sowie kompetente Hilfe bei fachlichen Fragen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden aus tiefstem Herzen dafür bedanken, dass sie mich in der ganzen Zeit so tatkräftig unterstützt haben. Ohne sie wäre die Fertigstellung der Doktorarbeit parallel zum Studium unvorstellbar gewesen.